Université de Lausanne — Faculté de Médecine
Institut d'Histologie et d'Embryologie
Directeur: Professeur O. Bucher

SYNTHESE DE L'ADN ET DES PROTEINES DANS LES PARTIES BULBAIRES DU COEUR EMBRYONNAIRE DE POULET IN OVO ET IN VITRO

THESE

Préparée sous la direction du Dr Th. Pexieder prof. ass. et présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

PIERRE CHAVAZ

Médecin diplômé de la Confédération Suisse
Originaire de Onex (GE)

Genève
Traitement du texte SA
1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0055

Université de Lausanne — Faculté de Médecine
Institut d'Histologie et d'Embryologie
Directeur: Professeur O. Bucher

SYNTHESE DE L'ADN ET DES PROTEINES DANS LES PARTIES BULBAIRES DU COEUR EMBRYONNAIRE DE POULET IN OVO ET IN VITRO

THESE

Préparée sous la direction du Dr Th. Pexieder prof. ass. et présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

PIERRE CHAVAZ

Médecin diplômé de la Confédération Suisse
Originaire de Onex (GE)

Genève
Traitement du texte SA
1977

Université de Lausanne

Faculté de Médecine

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs

O. BUCHER et M. DOLIVO,

et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée:

"SYNTHESE DE L'ADN ET DES PROTEINES DANS LES PARTIES BULBAIRES DU COEUR EMBRYONNAIRE DE POULET IN OVO ET IN VITRO",

présentée par Monsieur Pierre CHAVAZ,

Médecin diplômé de la Confédération suisse,

pour l'obtention du grade de Docteur en médecine.

Lausanne, le 27 juin *19* 77

Le Doyen:

Prof. G. Favez

UNIV. LEIDEN BIBL.

Je tiens à témoigner ma gratitude au Dr T. Pexieder, professeur-assistant à l'Institut d'Histologie et d'Embryologie, sans qui ce travail, de la conception à la réalisation, n'aurait pas vu le jour.

Je remercie le Professeur M. Dolivo, directeur de l'Institut de Physiologie, qui a mis aimablement à ma disposition la centrifugeuse, le spectrophotomètre et le spectromètre à scintillation liquide indispensables à la réalisation des analyses.

Je remercie le Professeur O. Bucher, directeur de l'Institut d'Histologie et d'Embryologie, de m'avoir accueilli dans son Institut.

TABLE DES MATIERES

I. Introduction 3

II. Matériel et méthodes 12

1. Culture 12

2. Marquage 14

3. Analyses 14

a. Mesure de la teneur en protéines 15

b. Mesure de l'incorporation des substances marquées 16

c. Elaboration statistique des résultats 16

4. Solutions, milieu et réactifs 17

III. Résultats 19

1. Teneur en protéines in ovo 19

2. Teneur en protéines in vitro 20

3. Incorporation de la leucine tritiée in ovo 20

4. Incorporation de la leucine tritiée in vitro 21

5. Incorporation de la thymidine tritiée in ovo 21

6. Incorporation de la thymidine tritiée in vitro 22

7. Comparaisons in ovo/in vitro 22

a. Teneur en protéines 22

b. Incorporation de la leucine tritiée 23

c. Incorporation de la thymidine tritiée 23

IV. Discussion 48

1. Méthodes 48

2. Métabolisme des protéines 50

3. Métabolisme de l'ADN 54

4. Comparaisons in ovo/invitro 58

5. Conclusion 60

V. Résumé 62

VI. Bibliographie 63

I. INTRODUCTION

Le développement embryonnaire des organes se fait au moyen de mécanismes cellulaires de base et de leur intégration spatiale et temporelle. On distingue, parmi ces mécanismes, la multiplication cellulaire, le changement de forme et de taille des cellules, leurs mouvements, la mort cellulaire physiologique et le "turnover" de la substance intercellulaire.

La mort cellulaire est un phénomène normal dans l'ontogénèse des Vertébrés et a été reconnue depuis longtemps comme telle (Glücksmann 1951). Il n'y a pratiquement pas un tissu ou un organe qui échappe à l'une des trois formes de dégénérescence physiologique définies par Kallius (1931) puis par Glücksmann (1951), c'est-à-dire la mort cellulaire phylogénétique, qui sert à éliminer des organes ou des restes d'organes vestigiaux ou larvaires (par exemple le pro- et le mésonéphros chez l'homme), la mort cellulaire histogénétique, qui joue un rôle dans la différenciation des tissus (exemple la mort du cartilage hypertrophié lors du processus d'ossification endochondrale) et la mort cellulaire morphogénétique, qui est utile au modelage de la forme de certains organes (par exemple la nécrose des zones interdigitales des extrémités).

Si l'on sait l'existence, et parfois le rôle, de la mort cellulaire pendant le développement embryonnaire, on en connaît beaucoup moins les causes et les déterminants; Saunders écrivait en 1966 et c'est toujours valable: "... it is unfortunate that little has been done to analyze (...) its embryonic control, the biochemical events in the onset and realization of necrosis...".

Pexieder (1971) a décrit, chez l'embryon de poulet, des zones de mort cellulaire physiologique pendant la morphogénèse du coeur. Il en a étudié la dynamique tissulaire et le rôle lors du développement normal du coeur (Pexieder 1972 a et b); il en a établi la stabilité phylogénétique (Pexieder et Paschoud 1973) en les retrouvant chez le poulet, le rat et l'homme. Logiquement, la

question des causes de cette mort cellulaire et de son contrôle s'est donc posée.

Une de ces zones de mort cellulaire physiologique se produit dans les coussinets bulbaires lors du cloisonnement du bulbe cardiaque chez l'embryon de poulet (entre le 3ème et le 6ème jour d'incubation, Pexieder 1972 c); pour essayer d'élucider le rôle du flux sanguin dans le déterminisme de cette zone de mort cellulaire, Pexieder (1972 d) a procédé au clampage des 6èmes arcs aortiques au 4ème jour d'incubation ce qui a modifié le régime hémodynamique dans le bulbe cardiaque et a conduit à la formation d'un défaut du septum interventriculaire à localisation sous-aortique. Pour tenter de trancher ensuite entre une mort cellulaire programmée, c'est-à-dire déclenchée par une information contenue dans le génome des cellules telle celle qu'ont décrite Fallon et Saunders (1968), qui serait, dans le cas du bulbe cardiaque, secondairement influencée par le flux sanguin et un type de mort cellulaire épigénétique, primairement déclenchée par l'hémodynamique, Pexieder (1973) a procédé à une expérience d'explantation en culture organotypique du bulbe cardiaque de l'embryon de poulet. Ceci afin de déterminer si, en l'absence du flux sanguin, les zones de mort cellulaire se produisaient aussi et de quelle manière. Cette expérience a donné les résultats suivants: lorsqu'on explante les bulbes cardiaques d'embryons de poulet au 3ème jour d'incubation et qu'on les maintient en culture organotypique pendant 48 heures, les nécroses physiologiques attendues ne se produisent pas; alors que si l'on explante ces mêmes bulbes au 4ème jour d'incubation et qu'on les maintient aussi en culture pendant 48 heures, les dégénérescences se produisent d'une manière semblable à ce qui se passe in ovo, bien qu'avec un peu de retard (Pexieder 1973). Ces événements étaient interprétés de la façon suivante: au 3ème jour d'incubation, l'hémodynamique n'a pas encore pu influencer le destin des cellules des coussinets bulbaires c'est pourquoi elles ne meurent pas en

culture; alors qu'au 4ème jour d'incubation, ces régions ont déjà subi in ovo, entre le 3ème et 4ème jour, l'influence du courant sanguin, ce qui expliquerait leur dégénérescence in vitro, malgré l'absence du flux sanguin. Cette interprétation était toutefois soumise à la condition de savoir si les processus de croissance et de dégénérescence étaient semblables in ovo et in vitro. C'est donc la question posée par Pexieder (1973) de savoir si les processus métaboliques des organes embryonnaires sont identiques in ovo et in vitro, question à laquelle ses recherches bibliographiques n'avaient pas permis de répondre, qui nous a incité à entreprendre ce travail.

Nous n'avons découvert dans la littérature que quelques travaux fournissant des données comparatives quantitatives du métabolisme d'un organe in vivo et en culture organotypique. L'un de Biggers (1960) qui compare la croissance en poids sec et humide in vivo et in vitro des cartilages tibiotarsaux d'embryons de poulet, un autre de Gwatkin et Biggers (1963) où cette fois c'est la teneur en ADN in vivo et in vitro de ces mêmes cartilages qui est comparée sur une période de quelques jours; la conclusion de ces deux travaux était que le milieu naturel fournit une croissance comparable à celle qui se produit in vivo, bien que légèrement plus faible, et que le milieu chimiquement défini, lui, ne fournit pas une croissance normale. On trouve dans le travail de Yalovski et coll. (1973) l'indication suivante: le pancréas embryonnaire de poulet en culture organotypique, que ce soit sur milieu semi-solide ou sur milieu liquide, ne montre pas de différence significative dans sa teneur en protéines et en ADN pendant 5 jours de culture, alors que pendant la même période in ovo elles s'accroissent de plusieurs fois leurs valeurs initiales.

Chez le foetus de rat, Lambert et collaborateurs (1970) ont montré que le pancréas endocrine in vivo et in vitro se développe morphologiquement de façon similaire et que son contenu en insuline

augmente de façon semblable (il est parfois même plus élevé in vitro); le pancréas exocrine lui se développe in vitro de façon plus lente qu'in vivo. Chez la souris, Idoyaga-Vargas et coll. (1972) ont établi que la différenciation du palais secondaire se fait morphologiquement in vivo et in vitro de façon comparable, à part à la surface médiane où il y a moins de dégénérescences in vitro; du point de vue biochimique, ils n'ont pas trouvé de différence significative entre l'activité in vivo et in vitro de la glucosaminidase et de l'arylsulfatase.

Dans le travail de Cintron (1972) sur la culture organotypique de cornée embryonnaire de poulet les données comparatives suivantes sont mentionnées: la culture avec sérum de cheval ajouté au milieu donne une incorporation de proline marquée similaire à celle observée in vivo, mais pas la culture avec sérum de veau, d'où l'auteur conclut que le fait que l'incorporation puisse être semblable in vivo et in vitro est probablement fortuit; il constate de plus une diminution de l'ADN en culture pendant les 12 premières heures alors qu'il s'accroît un peu in ovo pendant ce temps, diminution qu'il attribue à un dégât cellulaire lors de la préparation des cornées.

De ces quelques exemples à propos d'organes éloignés du coeur, nous ne pouvions pas tirer de conclusion utile. Nous avons donc décidé de reprendre les expériences d'explantation décrites par Pexieder (1972 a) et d'y envisager cette fois l'aspect métabolique. Puisque le but était de comparer des processus de développement et de régression in ovo et in vitro, il fallait donc doser et suivre des produits du métabolisme cellulaire qui aient des rapports étroits avec le développement et la régression. C'est pourquoi nous avons choisi de mesurer les protéines, comme valeur de référence, et de suivre le métabolisme des protéines et de l'ADN grâce à l'incorporation de traceurs radioactifs, ce qui nous fournissait trois paramètres importants pour un tissu embryonnaire en développement

ou en régression. La mesure puis la comparaison dans le temps de ces trois paramètres devait nous permettre de dire si les processus de développement et de régression sont comparables in ovo et in vitro tant du point de vue quantitatif que du point de vue de la vitesse de leur déroulement et, par là, nous aider à trancher entre les deux hypothèses de Pexieder: mort cellulaire épigénétique, c'est-à-dire uniquement déterminée par un facteur extérieur aux cellules qui vont mourir, en l'occurence le stress de contrainte exercé à ces endroits par le flux sanguin, ou mort cellulaire génétique, programmée dans le génome des cellules qui vont mourir et seulement secondairement influencée par des facteurs épigénétiques. D'autre part, cela permettait aussi de jeter les bases métaboliques quantitatives d'un modèle expérimental utilisé dans notre institut pour étudier le rôle de la mort cellulaire dans la morphogénèse et la tératogénèse cardiaques.

Pour situer ce travail dans un cadre plus général, il faut rappeler qu'à la suite du développement de la culture des tissus et des cellules, certains auteurs ont commencé à s'intéresser à la culture des organes et à leur croissance en dehors de l'organisme. En 1914 Thompson, pour la différencier de la croissance des cellules en culture, a appelé la croissance des organes explantés in vitro "croissance contrôlée", mais c'est Maximov qui en 1925 lui a donné son nom définitif de croissance organotypique, ce qui la différenciait de la croissance histotypique ou cytotypique ou encore "incontrôlée" (Thompson) des cellules en culture.

Strangeways et Fell (1926) ont été les premiers à utiliser la culture organotypique des organes embryonnaires à des fins expérimentales systématiques pour étudier le développement des bourgeons embryonnaires des membres du poulet. Depuis cette date, la culture organotypique s'est développée en deux courants: d'une part la culture sur milieu solide ou semi-solide dont les deux plus célèbres représentants sont Fell pour la culture sur caillot de plasma

et Wolff qui a introduit en 1952 avec Haffen le milieu à la gélose à l'agar, et, d'autre part, la culture sur milieu liquide introduite par Parker en 1936 puis mise au point par Trowell (1952, 1954) puis Chen (1954). Les avantages et désavantages respectifs des deux méthodes sont les suivants (Wolff et Haffen 1952, Trowell 1954, Chen 1954, Wolff 1957, Fainstat 1972, Monnickendam 1973): la méthode sur milieux solides est simple, fournit une bonne accessibilité des organes à l'observation, dans la technique de Wolff et Haffen elle empêche l'étalement, la migration cellulaire et la transformation en culture de cellules par une encapsulation ou réaction de membrane; ses désavantages sont que le substrat solide réduit la diffusion des substances nutritives vers l'explant et des métabolites de dégradation à partir de l'explant (d'où risque de malnutrition et de toxicité), d'autre part le transfert d'un milieu épuisé à un milieu neuf requiert le décollement de l'explant d'où un risque de traumatisme; de plus, le milieu n'est pas aisément modifiable ou analysable en cours d'expérience et finalement la partie de l'explant qui repose sur le milieu n'est pas aussi bien oxygénée que celle qui est en contact avec le mélange gazeux; ce dernier désavantage est partagé par la méthode sur milieu liquide, qui, elle, a pour autres inconvénients d'être un peu plus compliquée du point de vue du matériel et de la manipulation, d'avoir souvent des milieux trop riches qui favorisent l'étalement et la migration cellulaire; elle a en revanche pour qualités principales d'avoir un milieu facilement définissable, modifiable et analysable au cours des expériences, de faciliter la diffusion de divers produits de et vers l'explant, d'avoir une bonne accessibilité, de rendre le transfert d'un milieu à un autre très aisé puisque l'explant repose sur un support.

Pexieder (1972) a choisi, pour réaliser des conditions aussi proches que possible de celles qui existent in ovo, la méthode sur milieu liquide et a fait une modification de la méthode de Trowell

(1954). Cette modification consistait à déposer les moitiés de bulbe sur un filtre Milipore dans lequel était pratiquée une ouverture telle que le coussinet bulbaire passe à travers et se trouve ainsi en contact direct avec le milieu de culture, alors que le reste du bulbe n'était en relation avec le milieu qu'à travers le filtre Milipore déposé sur une grille d'acier inoxydable affleurant la surface du milieu. C'est en effet la méthode qui permet au coussinet bulbaire de garder sa forme et d'être nourri le mieux possible.

Si la culture organotypique a été utilisée par de nombreux auteurs pour des expériences de développement, de différenciation, d'induction, de nutrition, de métabolisme, de pharmacologie et cetera (Wolff 1970, Paul 1970), un relativement petit nombre de chercheurs s'est intéressé au coeur embryonnaire, qu'il soit de poulet ou d'un autre vertébré, en culture organotypique et aucun, à notre connaissance, au bulbe cardiaque explanté isolément. Les auteurs qui ont utilisé la culture organotypique du coeur embryonnaire sont: G. LeDouarin (1963) pour une étude de l'action de rayons X sur le coeur embryonnaire de poulet, Kirmann et LeDouarin (1964, 1965) pour des mesures métaboliques, LeDouarin et Kirmann (1964) pour une analyse de l'action des RX sur le coeur embryonnaire de poulet, LeDouarin, Obrecht et Coraboeuf (1964, 1965, 1966) pour des études électrophysiologiques du coeur embryonnaire de poulet, Obrecht, LeDouarin et Coraboeuf (1964, 1968) aussi pour des observations électrophysiologiques, LeDouarin et Renaud (1967) pour examiner la différenciation du coeur de poulet, Renaud et LeDouarin (1968, 1969) pour des études de la différenciation et de l'électrophysiologie du coeur embryonnaire de poulet. Ces différents expérimentateurs ont presque tous utilisé la technique sur milieu solide de Wolff et Haffen (1952). D'autres auteurs ont employé la technique de culture sur milieux liquides pour des observations métaboliques, morphologiques et fonctionnelles du coeur embryonnai-

re de poulet (Gessner et Boström 1965, Manasek et coll. 1973). Sperelakis et coll. (1974 a et b) ont comparé, de façon qualitative, l'électrophysiologie et l'ultrastructure du coeur embryonnaire de poulet pendant le développement normal et en culture organotypique sur milieu liquide ou par immersion dans le milieu. Wildenthal (1971), lui, a employé des coeurs de souris foetales en culture sur milieu liquide pour des études métaboliques et fonctionnelles. Aucun de ces auteurs ne s'est intéressé à comparer de façon quantitative le développement du coeur, ou du bulbe cardiaque, in vivo et en culture organotypique, que ce soit du point de vue morphologique, métabolique ou fonctionnel. De ce fait, notre travail est isolé, alors que du point de vue méthodologique, il emploie des techniques connues et largement utilisées depuis longtemps, puisque nous avons entrepris de comparer le développement in ovo et in vitro en dosant les protéines par le réactif de Folin et en mesurant l'incorporation de la thymidine et de la leucine tritiées par scintillation en phase liquide (cf. Matériel et méthodes).

Notre travail s'inscrit dans la tendance actuelle à la révision critique des résultats obtenus in vitro, particulièrement en embryologie expérimentale, comme le montre très bien l'article de Lash (1974). Lash, en effet, à propos de l'"antagonisme" prolifération-différenciation, à propos aussi de la nécessité d'une masse tissulaire critique pour la différenciation du cartilage in vitro, à propos encore de l'induction et des relations entre tissus dans la différenciation de divers organes, montre, en comparant les résultats obtenus par divers auteurs in vivo et in vitro, que les conclusions tirées des expériences in vitro ne sont pas simplement transposables in vivo et qu'elles ne sont souvent valables que pour les circonstances artificielles engendrées par la culture. A propos de la différenciation du pancréas en particulier, il pose la question générale de la différence de temps qui semble exister entre la

différenciation in vivo et in vitro, différence très importante en embryologie expérimentale, puisqu'on a affaire à des tissus en perpétuel changement (prolifération, régression, différenciation). Notre travail pose la question de la comparabilité des expériences in vivo et vitro et en particulier de la comparabilité du temps écoulé in vivo et in vitro, c'est-à-dire savoir si, pour le bulbe cardiaque de poulet, 24 heures de culture sont équivalentes à 24 heures de développement normal. Notons enfin que la question de la comparabilité in vivo-in vitro se pose tant du point de vue quantitatif que du point de vue qualitatif (cf. discussion). Notre travail veut contribuer à éclairer l'aspect quantitatif du problème.

II. MATERIEL ET METHODES

Des oeufs de poules Leghorn blanches de l'élevage de l'institut ont été incubés à 37°C dans une étuve à air pulsé et humidifié. A chaque stade choisi, c'est-à-dire pour l'expérience in ovo toutes les 8 heures entre 3 et 6 jours d'incubation (stades selon Hamburger et Hamilton 1951 de 19 à 30 environ) et pour l'expérience in vitro toutes les 8 heures pendant 40 heures de culture après explantation au 3ème jour et toutes les 8 heures pendant 48 heures de culture après explantation au 4ème jour, 15 embryons ont été employés (au total, en comptant les essais préliminaires et les stades pour lesquels nous avons procédé à deux ou plusieurs évaluations, 1005 embryons de poulet ont été utilisés). Ces embryons, répartis en 5 échantillons formés chacun de 3 moitiés droites et 5 échantillons formés chacun de 3 moitiés gauches de bulbes cardiaques, ont été obtenus de la manière suivante. Après ouverture de l'oeuf et de ses membranes, l'embryon a été séparé de sa vascularisation extra-embryonnaire, extrait de l'oeuf, plongé dans une solution de Ringer pour poulet et décapité. La paroi thoracique antérieure a été ensuite ouverte, le coeur excisé, le bulbe cardiaque découpé avec une partie des ventricules et les moitiés droites et gauches du bulbe séparées par une incision en spirale. Toutes ces opérations ont été conduites de façon stérile sous un microscope de dissection Wild, cf. schéma 1.

1. Culture

Il s'agit d'une modification de la méthode de Trowell (1954) décrite par Pexieder (1972). Les moitiés de bulbe cardiaque extraites de l'oeuf au 3ème ou au 4ème jour d'incubation ont été transférées l'une à côté de l'autre sur un filtre Millipore (TH, diamètre des pores 0,45 µm) dans lequel étaient pratiquées deux ouvertures ovales telles que l'on puisse disposer les moitiés de bulbe de façon à ce que les coussinets bulbaires pas-

DÉVELOPPEMENT IN OVO ET IN VITRO DU BULBE CARDIAQUE DE L'EMBRYON DE POULET.

I MÉTHODES

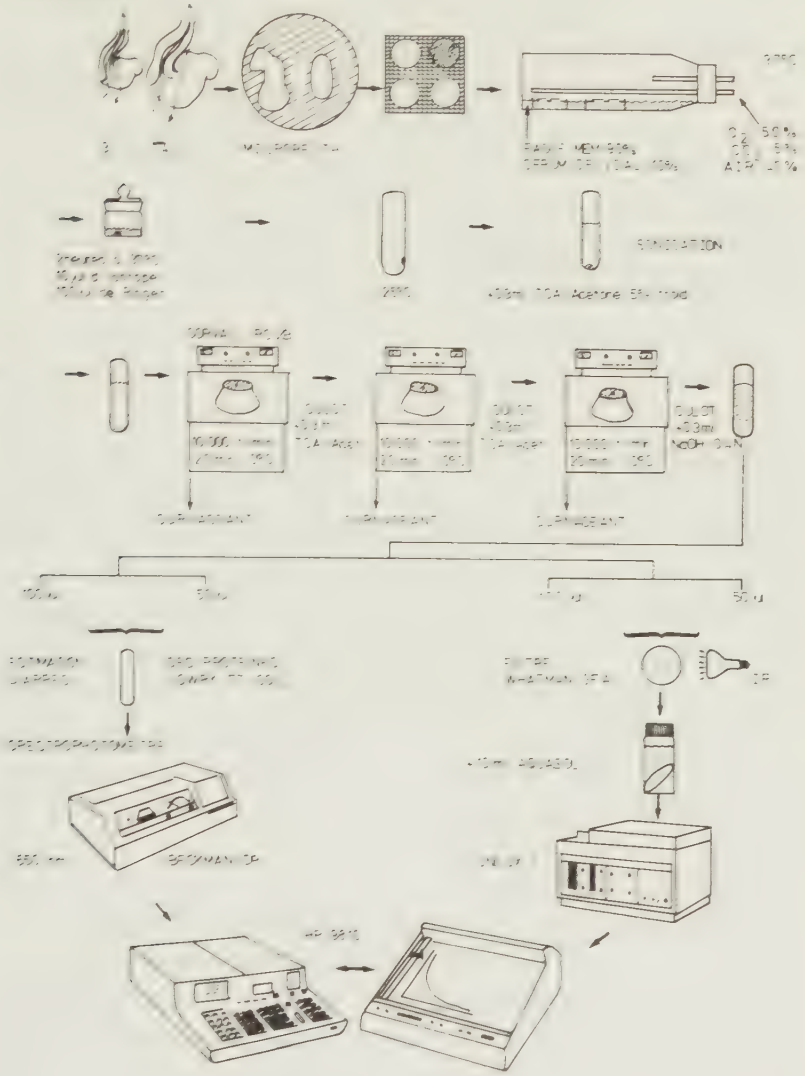

Schéma 1. Méthodes.

sent par ces ouvertures et que le reste du bulbe, et la petite partie ventriculaire attachée, reposent sur le filtre. Les filtres, portant chacun une moitié droite et une moitié gauche correspondantes, ont été déposés sur des grilles d'acier inoxydable servant de support et comportant 4 trous ronds un peu plus petits que les filtres qui pouvaient ainsi tenir au-dessus. Les grilles, chargées chacune de 4 filtres, ont été ensuite introduites dans une bouteille carrée dans laquelle a été ajouté le milieu de culture (cf. p.17) de façon à ce qu'il atteigne la face inférieure des filtres et donc baigne les coussinets bulbaires. Les bouteilles contenant les grilles ont été placées à 37°C dans l'incubateur et approvisionnées continuellement en mélange gazeux (cf. p.17).

2. Marquage

In vitro, après culture pendant la période choisie sans renouvellement du milieu, les explants ont été enlevés des filtres, introduits dans des pèse-filtre contenant 150 µl de Ringer et 10 µl de solution de thymidine ou de leucine tritiées (cf. p.18) et incubés dans ce mélange pendant 2 heures à 37°C. Après le marquage, les morceaux de bulbe ont été sortis du liquide radioactif, soigneusement essuyés, introduits dans de petits tubes de plastique et congelés à -25°C pour conservation jusqu'aux analyses. In ovo, après le découpage des moitiés de bulbe, elles ont été transférées directement dans des pèse-filtre, marquées et congelées de la même manière que les parties cultivées in vitro.

3. Analyses

Après addition de 0,3 ml d'acide trichloracétique-acétone froid (4°C), chaque échantillon a été homogénéisé par sonication à deux reprises à intensité moyenne (appareil Branson Sonic Power). Le précipité de protéines et d'acides nucléiques a été ensuite séparé du surnageant par centrifugation pendant 20 minutes à 10.000 tours/minutes (= 12350 g) à 0 $\pm$ 2° C; le surnageant jeté, le culot a été

repris par 0,3 ml de TCA et recentrifugé de la même manière. Ce lavage a été pratiqué à trois reprises pour éliminer le surplus de substance marquée non incorporée dans les protéines ou l'ADN. Le dernier culot de centrifugation a été resuspendu dans 0,3 ml de NaOH 0,4 N à la température de la pièce et hydrolysé pendant 1 heure dans cette solution.

a. Mesure de la teneur en protéines. Il s'agit d'une légère modification de la méthode de Lowry et coll. (1951), modification qui consiste, vu les faibles quantités que nous avions à doser, à diviser par deux le volume des solutions C et D (cf. p.18) préconisées par Lowry et coll. et à lire au spectrophotomètre à 650 nm au lieu d'à 750 nm (cf. discussion). Des aliquots de 100 et de 50 µl d'hydrolysat de chaque échantillon ont été pipettés dans des petits tubes à essais en verre. Aux aliquots de 50 µl ont été ajoutés 50 µl d'eau distillée pour atteindre le même volume final. Ensuite à chacun des aliquots ont été additionnés 0,5 ml de solution C (cf. p. 18), puis, après 10 minutes, 50 µl de solution D (cf. p. 18) en mélangeant au mélangeur électrique. Après 30 minutes pour laisser la réaction colorée se développer, l'absorption de la lumière à 650 nanomètres a été mesurée avec un spectrophotomètre Beckman DB pour chaque échantillon en comparaison avec un "blanc" composé de 100 µl d'eau distillée, de 0,5 ml de solution C et de 50 µl de solution D. Pour chaque groupe de mesures, l'absorption de la lumière par desquantités connues d'albumine bovine cristallisée mise en solution dans de l'eau distillée (2,5/5,0/7,5/10/12,5 µg d'albumine dans 100 µl d'H_2O) a été déterminée de la même façon que pour les échantillons; d'après les résultats une courbe standard a été tracée, courbe qui a permis par simple report d'évaluer la quantité de protéines des échantillons inconnus.

b. Mesure de l'incorporation des substances marquées. Un aliquot de 100 µl et un de 50 µl par échantillon ont été pipettés sur des filtres de papier de fibre de verre Whatman GF/A de 2,5 cm de diamètre et mis à sécher pendant 2 heures sous une lampe à rayons infra-rouges. Les filtres secs ont été ensuite introduits au fond de flacons de verre, la face enduite de substance séchée tournée vers le haut, et recouverts par 10 ml de liquide de scintillation (cf. p.). Les flacons, une fois bouchés hermétiquement, ont été mis à 4°C pendant la nuit. Le lendemain matin, la radioactivité des échantillons ainsi préparés a été mesurée par comptage dans un spectromètre à scintillation liquide Unilux I 6850 de Nuclear Chicago après stabilisation à l'obscurité pendant 1 heure. Chaque échantillon a été compté pendant 10 minutes. Le bruit de fond, mesuré sur un "blanc" composé du filtre enduit de 100 ou de 50 µl de NaOH 0,4 N, puis séché, introduit dans un flacon et recouvert par 10 ml de liquide de scintillation, a été soustrait des résultats obtenus pour chaque échantillon. Le spectromètre à scintillation liquide a été employé selon la méthode du "balance point counting" (Nuclear Chicago), réglé d'après le spectre d'émission d'une solution pure de substance marquée séchée sur un filtre et introduite dans un flacon identique où elle a été recouverte de 10 ml de liquide de scintillation.

Le nombre de décompositions par minute par échantillon divisé par le nombre de microgrammes de protéines par échantillon a donné l'activité spécifique leucine ou thymidine de chaque moitié droite ou gauche à chaque stade choisi in ovo ou in vitro.

c. Elaboration statistique des résultats. La moyenne de l'activité spécifique mesurée dans les aliquots de 100 et de 50 µl a été prise en considération pour tous les échantillons, puisque le test T pour les observations paires (Hewlett Packard) pratiqué sur les mesures de 100 et de 50 µl de 2 stades in ovo et in vitro (4j8h et 4j16h in ovo, 3 j cultivé 24h et 4j cultivé 24h in vitro)

n'a pas montré de différence significative entre les résultats obtenus sur 100 ou 50 µl. Etant donné le relativement faible nombre de mesures par stade (5 moitiés droites, 5 moitiés gauches, 100 et 50 µl chaque fois), les résultats ont été soumis à un test graphique destiné à savoir s'ils avaient une distribution normale ou non (programme "Normal Probability Plot" Hewlett Packard réalisé avec la calculatrice programmable et le traceur Hewlett Packard 9810A et 9862A). La distribution de nos résultats ne s'étant montrée normale que pour moins de 60% des cas, le choix s'est donc porté, pour comparer les résultats entre eux, sur un test non paramétrique, le test de Wilcoxon. Ce test, programmé en Fortran, a été exécuté sur l'ordinateur CDC CYBER du centre de calcul de l'EPFL. Il a d'abord été appliqué à l'intérieur de chaque stade pour comparer les moitiés droites aux moitiés gauches, qui se sont révélées non significativement différentes ($p \leq 0,05$), sauf dans le cas des protéines in ovo. Ceci a permis de mettre ensemble (sauf pour le cas précité) les moitiés droites et gauches pour la suite des opérations. Le test de Wilcoxon a été employé ensuite pour comparer les divers stades à tous les autres (comparaisons mutuelles) et pour comparer les valeurs des stades correspondants in ovo et in vitro (comparaisons paires). Pour évaluer l'évolution temporelle des résultats, les régressions polynomiales ont été calculées et tracées avec la calculatrice programmable Hewlett Packard 9810A et 9862A de l'Institut.

Solutions, milieu de culture, réactifs

Milieu de culture :

Minimum Essential Medium Eagle 90% avec L-glutamine, sans bicarbonate de sodium, Schwarz-Mann, Orangebourg, New York.
sérum de veau 10%
streptomycine 12,5 µg/ml
pénicilline G 7,5 µg/ml
mélange gazeux pour la culture: O_2 50%, CO_2 5% et air 45%

Acide trichloracétique-acétone (TCA) :

acétone 450 ml

eau distillée 500 ml

acide trichloracétique 50 gr

Solutions pour le marquage :

thymidine (methyl-^{3}H) activité spécifique 50,7 Ci/mmole,

concentration 1,0 mCi= 0,00478 mg/ml

L- leucine (4,5-^{3}H/N/)activité spécifique 5 Ci/mmole,

concentration 1 mCi= 0,026 mg/ml

New England Nuclear, Boston, Mass.

Solutions pour le dosage des protéines :

solution A:

carbonate de sodium 20 gr

hydroxyde de sodium 4 gr

tartrate de sodium-potassium 0,2 gr

eau distillée 950 ml, complété à 1000 ml après dissolution

solution B:

sulfate de cuivre 1 gr

eau distillée 200 ml

solution C:

50 volumes de solution A

1 volume de solution B

solution D:

réactif de Folin-Ciocalteu 5 ml

eau distillée 5 ml

Liquide de scintillation :

Aquasol, Universal LSC Cocktail, New England Nuclear, Boston, Mass.

III. RESULTATS

1. Teneur en protéines in ovo

La valeur moyenne et l'écart-type de chaque stade du développement in ovo se trouvent dans le tableau I pour les moitiés droites et dans le tableau II pour les moitiés gauches. Les figures 1 et 2 représentent les courbes de régression polynomiales de la teneur en protéines en fonction du temps des moitiés droites et gauches respectivement. Les tableaux III a, b, c et d montrent le résultat des comparaisons entre les stades consécutifs par le test de Wilcoxon.

On voit que pendant le développement normal dans l'oeuf la teneur en protéines des moitiés droites et gauches du bulbe cardiaque montre une tendance générale à une croissance régulière. Le fait que les différences ne soient pas toujours significatives d'un stade à l'autre et même qu'à une ou deux reprises le stade immédiatement plus âgé contienne moins de protéines que celui qui le précède (la différence n'est jamais significative) provient du fait qu'à âge égal (temps d'incubation identique) et à développement morphologique égal (stade selon Hamburger et Hamilton identique) les embryons peuvent avoir une grande variété de taille et, partant, de teneur en protéines. La relative petitesse du nombre d'embryons par stade a pu permettre que la distribution normale des tailles ne soit pas couverte sur toute son étendue et qu'ainsi les embryons de taille plus petite que la moyenne puissent prédominer dans un stade. Ceci est bien illustré par le fait qu'une différence non significative entre 2 stades consécutifs lors de la première série d'expériences ne se reproduit pas lors de la deuxième série d'expériences entre ces deux mêmes stades. Par exemple nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la teneur en protéines entre 3j16h et 4j, ni entre 4j16h et 5j, ni entre 5j8h et 5j16h lors de la première série de dosages (métabolisme de

la leucine) et nous en avons trouvé une lors de la deuxième série de mesures (métabolisme de l'ADN) entre ces mêmes stades, le stade le plus âgé étant toujours plus riche en protéines.

2. Teneur en protéines in vitro

Le tableau IV contient la moyenne et l'écart-type de chaque stade en culture après explantation au 3ème et au 4ème jour moitiés droites, le tableau V ceux des moitiés gauches. La figure 3 présente la courbe de régression de la teneur en protéines en fonction du temps après explantation au 3ème jour, la 4 celle de la teneur après explantation au 4e jour. Le tableau VI contient les comparaisons d'un stade consécutif à l'autre d'après le test de Wilcoxon. Les moitiés droites et gauches sont ensemble sur les courbes de régression parce qu'elles ne sont pas, contrairement aux moitiés droites et gauches in ovo, significativement différentes d'après le test de Wilcoxon comparant les stades droits et gauches correspondants.

On constate ici que, malgré certaines différences significatives en plus ou en moins d'un stade à l'autre, la tendance générale de la teneur en protéines du bulbe cardiaque en culture organotypique, que ce soit après explantation au 3ème ou au 4ème jour, n'est pas à la croissance régulière comme in ovo mais bien à la stabilité.

3. Incorporation de la leucine tritiée in ovo

Les activités spécifiques moyennes calculées pour les moitiés droites et gauches ensemble d'après les résultats des échantillons de 100 et de 50 µl ainsi que leurs écart-type se trouvent dans le tableau VII. Dans le tableau VIII on compare les divers stades consécutifs entre eux par le test de Wilcoxon. La figure 5 représente la courbe de régression polynomiale de l'évolution temporelle de l'incorporation de la leucine tritiée pendant le développement dans l'oeuf.

On voit donc que l'incorporation de la leucine commence par diminuer rapidement jusque vers 4 jours, puis la descente se ralentit entre 4j et 4j16h, ensuite l'incorporation tend à se stabiliser entre 4j16h et 5j8h pour redescendre entre 5j8h et 6j.

4. Incorporation de la leucine tritiée in vitro

La moyenne et l'écart-type de chaque stade se trouvent dans le tableau IX, les courbes de régression de l'évolution temporelle aux figures 6, après explantation au 3ème jour, et 7 après explantation au 4ème jour; le tableau X montre le résultat des comparaisons entre les stades consécutifs par le test de Wilcoxon.

In vitro donc, à partir d'un niveau beaucoup plus bas qu'in ovo, la courbe de régression de l'incorporation de la leucine présente une légère descente, puis une stabilité entre 16 et 24 à 32 heures de culture après explantation au 3ème jour, stabilité suivie par une redescente plus nette à partir de 32 heures de culture. Après explantation au 4ème jour, l'incorporation débute après 8 heures de culture à un niveau presque identique à celui atteint in ovo, décroît très discrètement jusqu'à 32 heures de culture; puis une légère remontée s'amorce à partir de 40 heures de culture.

5. Incorporation de la thymidine tritiée in ovo

La moyenne et l'écart-type de chaque stade (moitiés droites et gauches mises ensemble car non significativement différentes par le test de Wilcoxon) se trouvent dans le tableau XI. La figure 8 donne la courbe de régression en fonction du temps et le tableau XII les résultats des comparaisons des stades consécutifs par le test de Wilcoxon.

On voit que l'incorporation de la thymidine tritiée in ovo diminue tout d'abord entre 3j8h et 4j, reste ensuite stable entre 4j et 5j8h, puis décroît à nouveau entre 5j8h et 6j.

6. Incorporation de la thymidine tritiée in vitro

Les résultats, sous forme de moyenne et d'écart-type, se trouvent au tableau XIII, la courbe de régression en fonction du temps à la figure 9 pour les stades cultivés après explantation au 3ème jour et à la figure 10 pour ceux explantés au 4ème jour. Les comparaisons des stades consécutifs par le test de Wilcoxon se trouvent au tableau XIV.

In vitro après explantation au 3ème jour l'incorporation de la thymidine débute à un niveau assez bas à 8 heures de culture, augmente très rapidement jusqu'entre 16 et 24 heures de culture puis redescend presque aussi brutalement jusqu'entre 32 et 40 heures pour finir en amorçant une remontée vers 40 heures de culture. Après explantation au 4ème jour, l'incorporation est stable entre 8 et 24 heures de culture environ, puis augmente lentement jusqu'à 48 heures de culture.

7. Comparaisons in ovo / in vitro

a. Teneur en protéines. Le tableau XV donne les résultats des comparaisons paires par le test de Wilcoxon entre les stades correspondants in ovo et in vitro: a) entre les moitiés droites de la première série d'expériences, b) entre les moitiés gauches de la première série d'expériences, c) entre les moitiés droites de la deuxième série d'expériences et d) entre les moitiés gauches de cette seconde série.

On voit, sur ces tableaux, que les moitiés de bulbes cardiaques in ovo sont toujours plus grandes qu'in vitro, à part à 3j8h où la différence n'est pas significative. La différence in ovo - in vitro est donc généralement significative dès 16 heures de culture, ce que la figure 11, réalisée par superposition des courbes de régression in ovo et in vitro, illustre bien.

b. Incorporation de la leucine tritiée. Les comparaisons paires entre les stades correspondants in ovo et in vitro sont rassemblés dans le tableau XVI. La superposition des courbes de régression à la figure 12 met en évidence les différences existant entre l'incorporation in ovo et in vitro. Après explantation au 3ème jour elle commence, in vitro, beaucoup plus bas qu'in ovo, elle décroît plus lentement, se stabilise entre 16 et 32 heures de culture pour redescendre ensuite. Après explantation au 4ème jour l'incorporation de la leucine, bien qu'à un niveau grossièrement comparable in ovo et in vitro, est toujours plus élevée in ovo qu'in vitro sauf à 48 heures de culture où la différence n'est pas significative.

c. Incorporation de la thymidine tritiée. Le tableau XVII rassemble les résultats des comparaisons paires entre les stades correspondants in ovo et in vitro. Par la superposition des courbes de régression par rapport au temps in ovo et in vitro (fig. 13), on voit que l'incorporation de la thymidine tritiée in vitro après explantation au 3ème jour, bien que débutant à un niveau significativement plus bas qu'in ovo, a déjà atteint à 16 heures de culture un niveau qui dépasse de plus du triple celui atteint à la période correspondante in ovo. L'incorporation in vitro décroît ensuite rapidement mais reste toujours plus élevée qu'in ovo; elle amorce une remontée vers 40 heures de culture, alors qu'in ovo la lente décroissance a été suivie par une stabilisation. Après explantation au 4ème jour en revanche l'incorporation débute à un niveau comparable à celui atteint in ovo (les différences ne sont pas significatives jusqu'à 24 heures de culture) puis elle croît lentement et dépasse à 32 heures le niveau du stade correspondant in ovo, puisqu'il y a baisse à ce moment in ovo, et reste plus élevée jusqu'à la fin en continuant de croître lentement.

In ovo	Expérience 1*		Expérience 2**	
Moitiés droites	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
3j	1,78	0,47	--	--
3j8h	3,72	1,76	3,26	1,81
3j16h	6,24	1,68	5,42	1,82
4j	7,50	2,69	11,94	1,70
4j8h	15,28	0,51	11,57	2,10
4j16h	15,04	6,38	10,83	2,98
5j	12,74	3,35	17,63	2,73
5j8h	24,04	2,52	18,10	4,34
5j16h	24,94	1,60	23,64	2,36
6j	35,80	2,23	33,33	7,55

Tableau I: teneur en protéines en µg pendant le développement in ovo, moitiés droites

In ovo	Expérience 1*		Expérience 2**	
Moitiés gauches	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
3j	1,94	0,88	--	--
3j8h	6,92	0,70	4,66	2,16
3j16h	5,68	2,10	7,81	0,75
4j	10,46	1,13	12,37	4,14
4j8h	16,46	2,84	12,67	3,46
4j16h	20,18	2,95	15,76	2,83
5j	23,14	4,64	25,02	4,83
5j8h	30,72	3,01	19,94	6,04
5j16h	31,82	3,41	28,11	2,05
6j	40,26	2,09	35,28	2,20

Tableau II: teneur en protéines en µg pendant le développement in ovo, moitiés gauches

*Expérience 1 : marquage par la leucine tritiée

**Expérience 2 : marquage par la thymidine tritiée

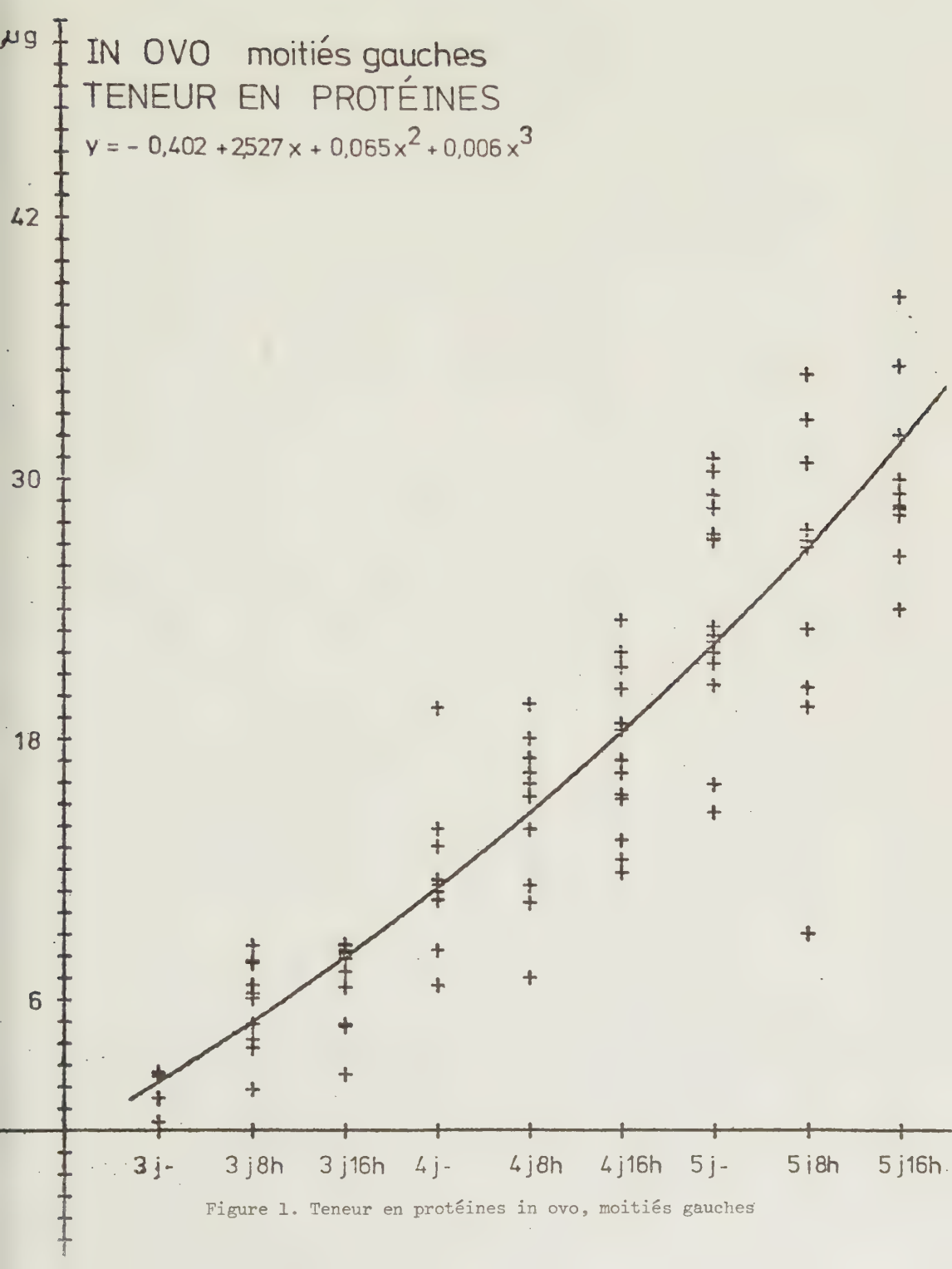

Figure 1. Teneur en protéines in ovo, moitiés gauches

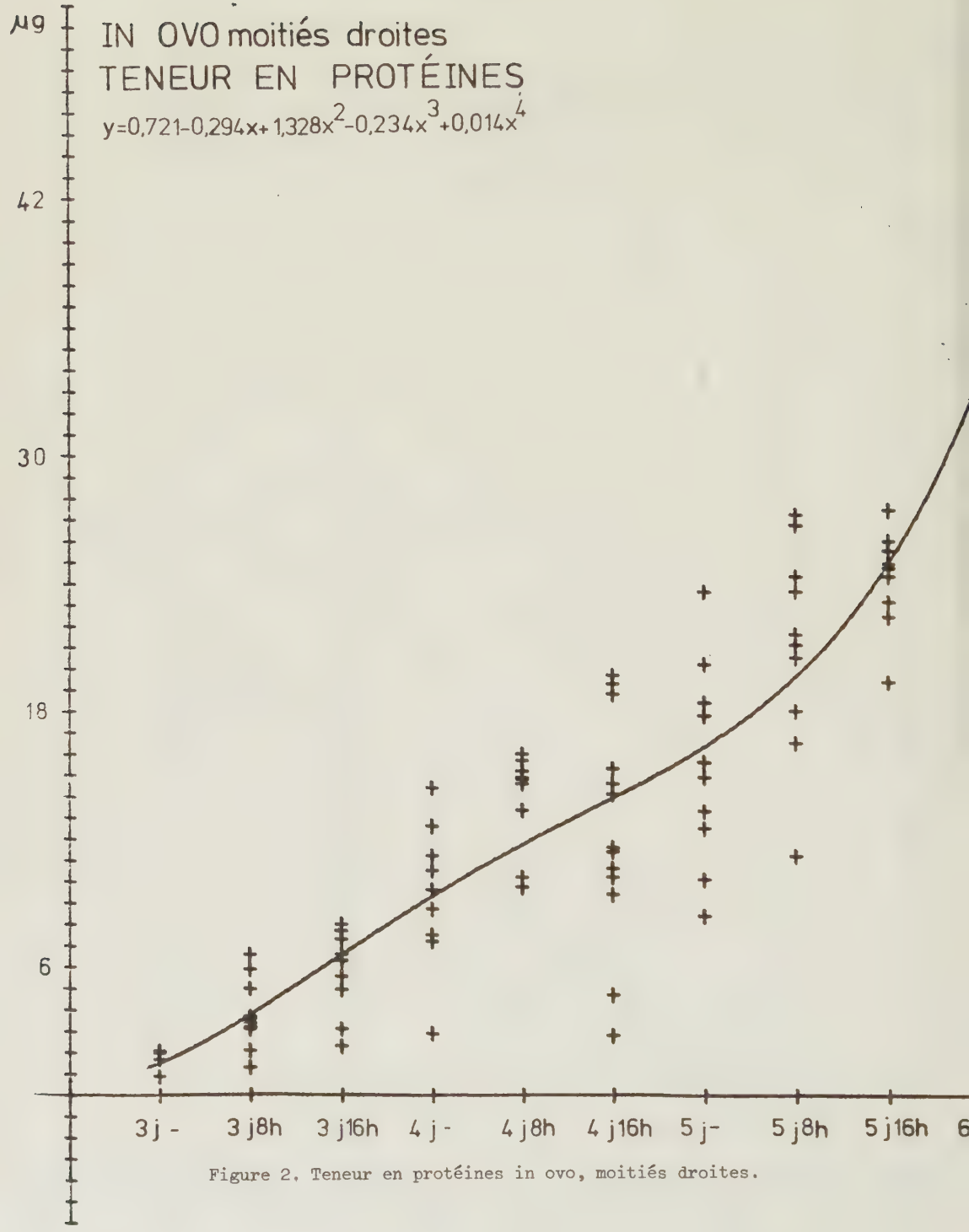

Figure 2. Teneur en protéines in ovo, moitiés droites.

Expérience 1

Protéines moitiés droites		
3j	$\prec$	3j8h
3j8h	$\prec$	3j16h
3j16h	·	4j
4j	$\prec$	4j8h
4j8h	·	4j16h
4j16h	·	5j
5j	$\prec$	5j8h
5j8h		5j16h
5j16h	$\prec$	6j

a

Protéines moitiés gauches		
3j	$\prec$	3j8h
3j8h	·	3j16h
3j16h	$\prec$	4j
4j	$\prec$	4j8h
4j8h	$\prec$	4j16h
4j16h	·	5j
5j	$\prec$	5j8h
5j8h	·	5j16h
5j16h	$\prec$	6j

b

Expérience 2

Protéines moitiés droites		
3j8h	·	3j16h
3j16h	$\prec$	4j
4j	·	4j8h
4j8h	·	4j16h
4j16h	$\prec$	5j
5j	·	5j8h
5j8h	$\prec$	5j16h
5j16h	$\prec$	6j

c

Protéines moitiés gauches		
3j8h	$\prec$	3j16h
3j16h	$\prec$	4j
4j	·	4j8h
4j8h	·	4j16h
4j16h	$\prec$	5j
5j	$\prec$	5j8h
5j8h	$\prec$	5j16h
5j16h	$\prec$	6j

d

Tableau III: différences entre les stades consécutifs in ovo, teneur en protéines.

· = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

$\prec$ = significativement plus petit que, ($p \leq 0,05$)

$\succ$ = significativement plus grand que, ($p \leq 0,05$)

In vitro	Expérience 1*		Expérience 2**	
Moitiés droites	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
3j cult. 8h	5,14	1,09	3,37	0,99
3j cult.16h	3,10	0,60	1,47	1,10
3j cult.24h	3,07	1,12	2,26	0,88
3j cult.32h	2,14	0,60	1,98	0,52
3j cult.40h	3,66	1,01	3,92	1,47
4j cult. 8h	13,32	4,50	7,85	1,43
4j cult.16h	6,72	2,59	5,74	1,93
4j cult.24h	10,42	0,66	4,46	2,27
4j cult.32h	8,00	2,93	4,72	1,05
4j cult.40h	7,56	4,24	8,46	2,58
4j cult.48h	9,42	1,53	4,05	1,38

Tableau IV: teneur en protéines en µg pendant le développement in vitro, moitiés droites

In vitro	Expérience 1*		Expérience 2**	
Moitiés gauches	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
3j cult. 8h	4,86	1,28	3,64	1,38
3j cult.16h	4,30	0,72	2,00	0,99
3j cult.24h	3,08	0,94	4,20	2,04
3j cult.32h	4,18	0,76	3,18	0,78
3j cult.40h	3,21	0,68	4,74	1,12
4j cult. 8h	11,02	2,08	8,15	2,05
4j cult.16h	10,75	2,72	8,84	4,23
4j cult.24h	11,16	1,31	6,84	2,01
4j cult.32h	5,96	2,72	7,62	2,15
4j cult.40h	9,26	5,03	12,68	2,24
4j cult.48h	9,28	2,14	8,08	1,64

Tableau V: teneur en protéines en µg pendant le développement in vitro, moitiés gauches

*Expérience 1 : marquage par la leucine tritiée

**Expérience 2 : marquage par la thymidine tritiée

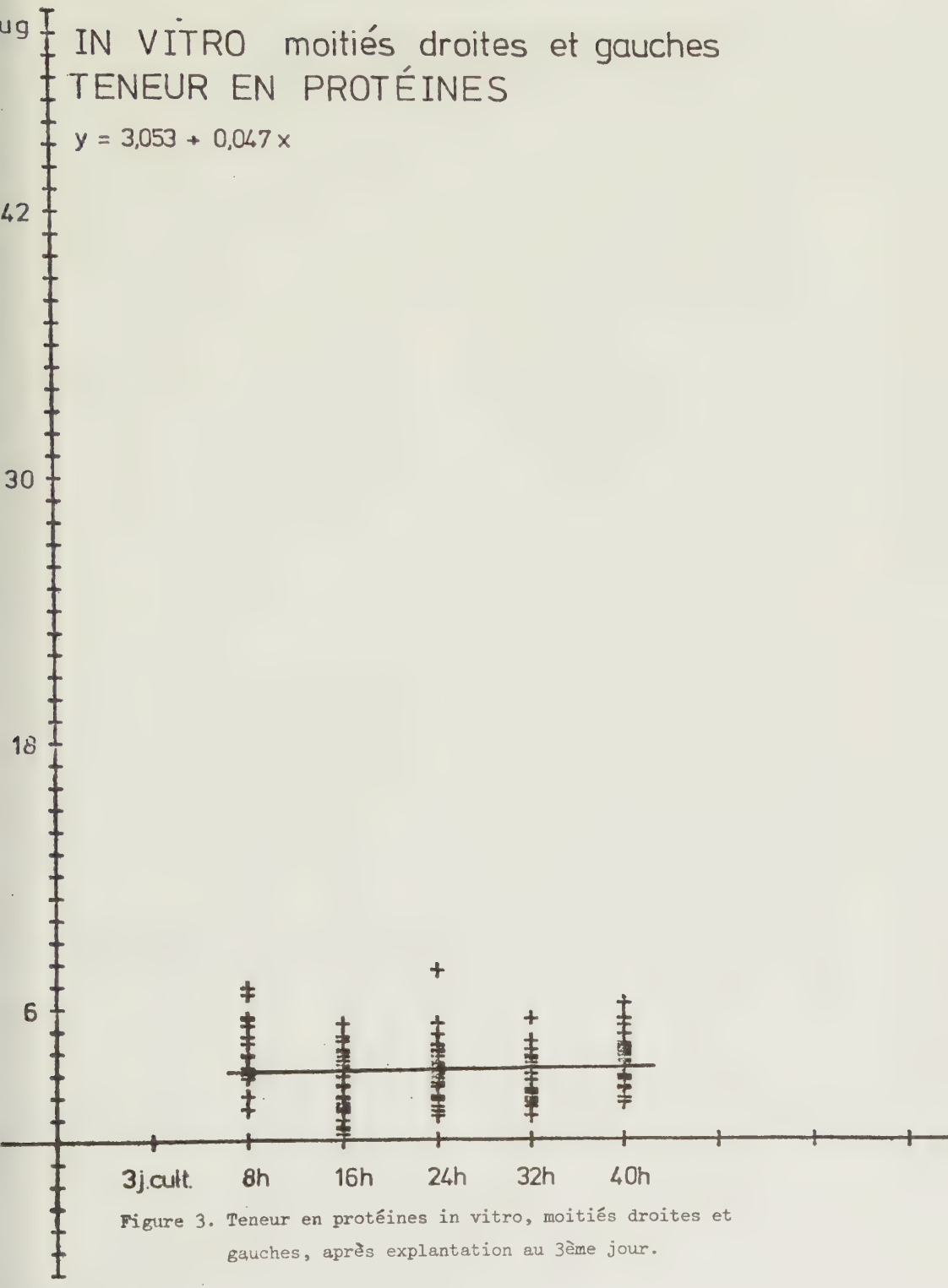

Figure 3. Teneur en protéines in vitro, moitiés droites et gauches, après explantation au 3ème jour.

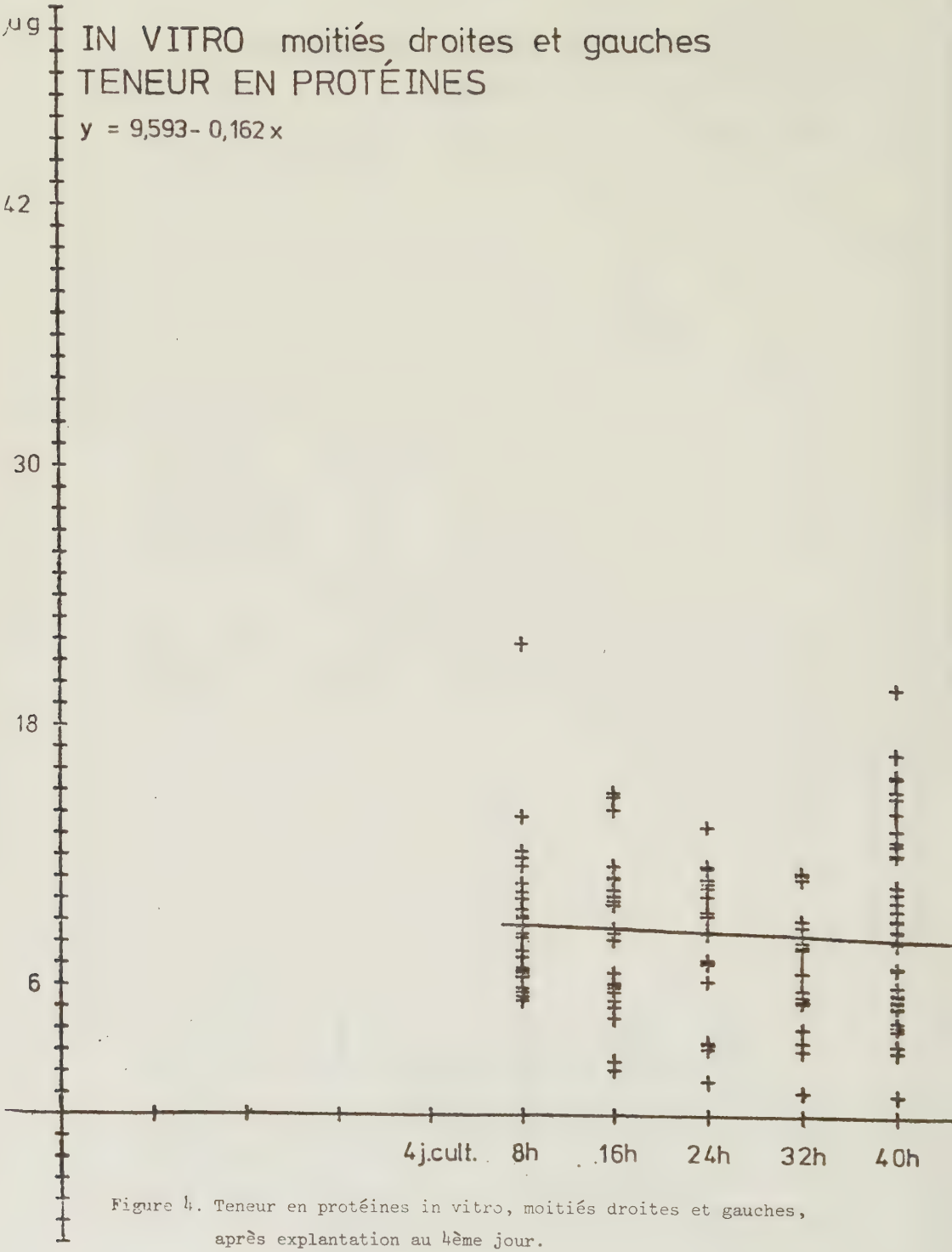

Figure 4. Teneur en protéines in vitro, moitiés droites et gauches, après explantation au 4ème jour.

Expérience 1

Protéines moitiés droites
3j cult.8h > 3j cult.16h
3j cult.16h · 3j cult.24h
3j cult.24h · 3j cult.32h
3j cult.32h < 3j cult.40h
4j cult.8h > 4j cult.16h
4j cult.16h < 4j cult.24h
4j cult.24h · 4j cult.32h
4j cult.32h · 4j cult.40h
4j cult.40h · 4j cult.48h

a

Protéines moitiés gauches
3j cult.8h · 3j cult.16h
3j cult.16h > 3j cult.24h
3j cult.24h < 3j cult.32h
3j cult.32h > 3j cult.40h
4j cult.8h · 4j cult.16h
4j cult.16h · 4j cult.24h
4j cult.24h > 4j cult.32h
4j cult.32h · 4j cult.40h
4j cult.40h · 4j cult.48h

b

Expérience 2

Protéines moitiés droites
3j cult.8h > 3j cult.16h
3j cult.16h < 3j cult.24h
3j cult.24h · 3j cult.32h
3j cult.32h < 3j cult.40h
4j cult.8h > 4j cult.16h
4j cult.16h · 4j cult.24h
4j cult.24h · 4j cult.32h
4j cult.32h < 4j cult.40h
4j cult.40h > 4j cult.48h

c

Protéines moitiés gauches
3j cult.8h > 3j cult.16h
3j cult.16h < 3j cult.24h
3j cult.24h · 3j cult.32h
3j cult.32h < 3j cult.40h
4j cult.8h · 4j cult.16h
4j cult.16h · 4j cult.24h
4j cult.24h · 4j cult.32h
4j cult.32h < 4j cult.40h
4j cult.40h > 4j cult.48h

d

Tableau VI: différences entre les stades consécutifs in vitro, teneur en protéines.

·, <, > : cf. p. 32

In ovo	Moyenne	Ecart-type
3j	346,42	81,59
3j8h	167,19	50,72
3j16h	115,95	36,07
4j	105,78	29,42
4j8h	88,03	10,81
4j16h	65,01	18,26
5j	62,45	17,71
5j8h	46,10	8,86
5j16h	35,30	9,66
6j	39,40	6,15

Tableau VII: incorporation de la leucine tritiée in ovo (en CPM/µg prot.) moitiés droites et gauches ensemble.

AS leucine		
3j	>	3j8h
3j8h	>	3j16h
3j16h	·	4j
4j	>	4j8h
4j8h	>	4j16h
4j16h	·	5j
5j	>	5j8h
5j8h	>	5j16h
5j16h	>	6j

Tableau VIII: différences entre les stades consécutifs in ovo, incorporation de la leucine tritiée.

· = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leqslant 0,05$)

$<$ = significativement plus petit que, ($p \leqslant 0,05$)

$>$ = significativement plus grand que, ($p \leqslant 0,05$)

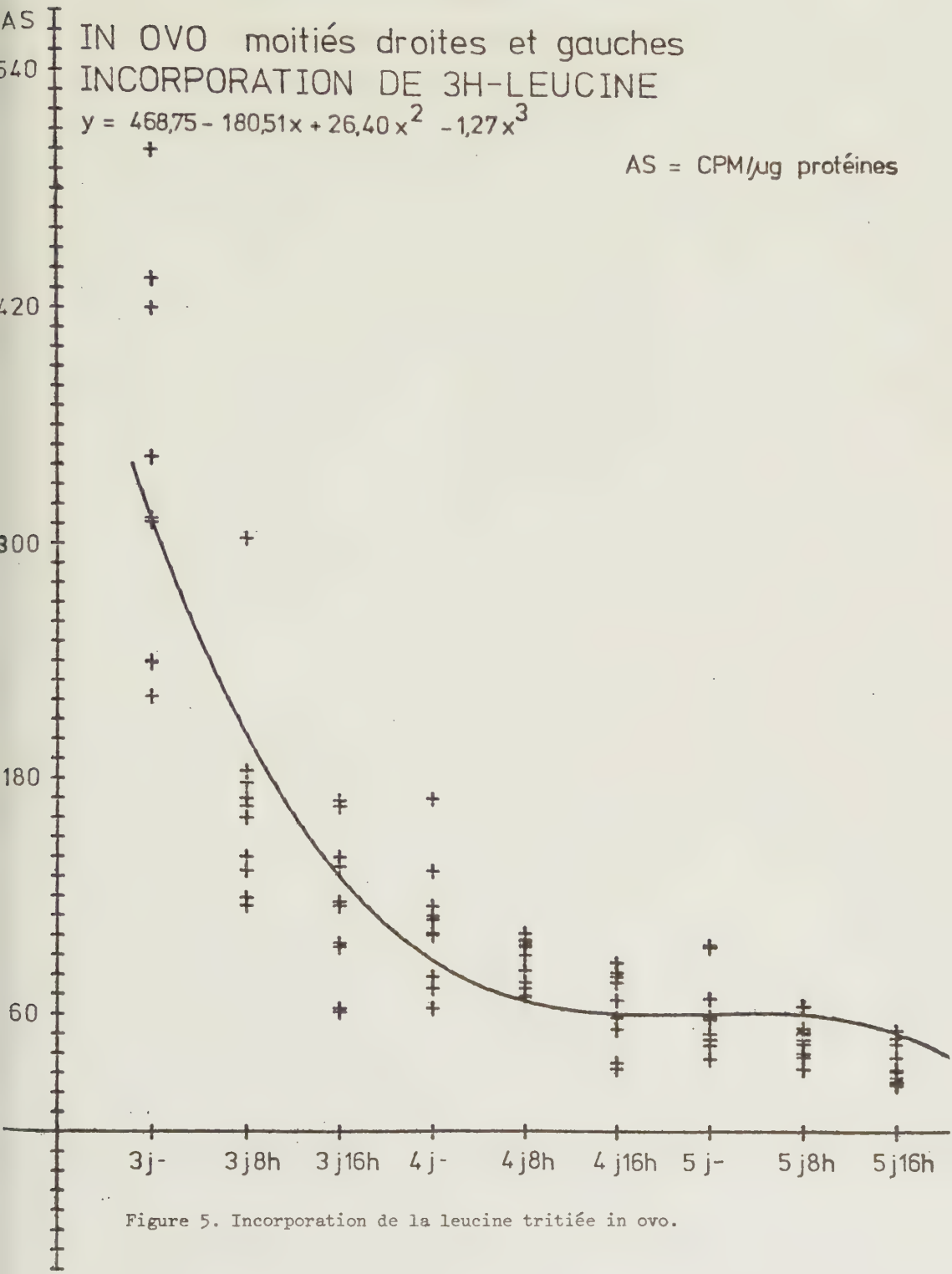

Figure 5. Incorporation de la leucine tritiée in ovo.

In vitro	Moyenne	Ecart-type
3j cult.8h	101,73	21,20
3j cult.16h	97,39	12,78
3j cult.24h	72,36	26,19
3j cult.32h	88,70	18,17
3j cult.40h	46,11	8,33
4j cult.8h	66,11	13,58
4j cult.16h	55,84	10,90
4j cult.24h	43,47	7,64
4j cult.32h	24,34	20,79
4j cult.40h	65,32	17,19
4j cult.48h	39,03	14,69

Tableau IX: incorporation de la leucine tritiée in vitro, (en CPM/µg protéines), moitiés droites et gauches.

AS leucine	
3j cult.8h	• 3j cult.16h
3j cult.16h	> 3j cult.24h
3j cult.24h	< 3j cult.32h
3j cult.32h	> 3j cult.40h
4j cult.8h	> 4j cult.16h
4j cult.16h	> 4j cult.24h
4j cult.24h	• 4j cult.32h
4j cult.32h	< 4j cult.40h
4j cult.40h	> 4j cult.48h

Tableau X: différences entre les stades consécutifs in vitro, incorporation de la leucine tritiée.

• = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

< = significativement plus petit que, ($p \leq 0,05$)

> = significativement plus grand que, ($p \leq 0,05$)

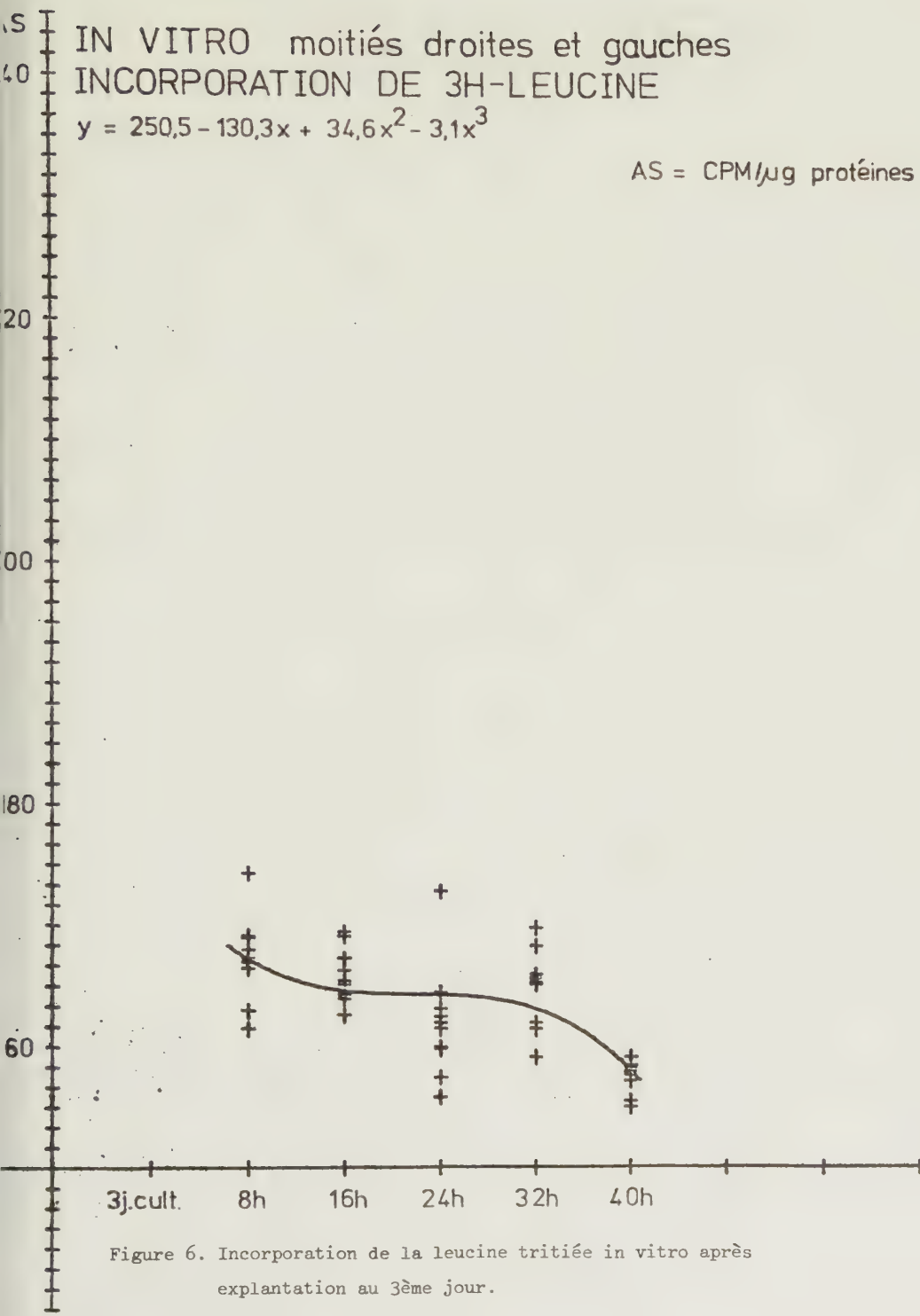

Figure 6. Incorporation de la leucine tritiée in vitro après explantation au 3ème jour.

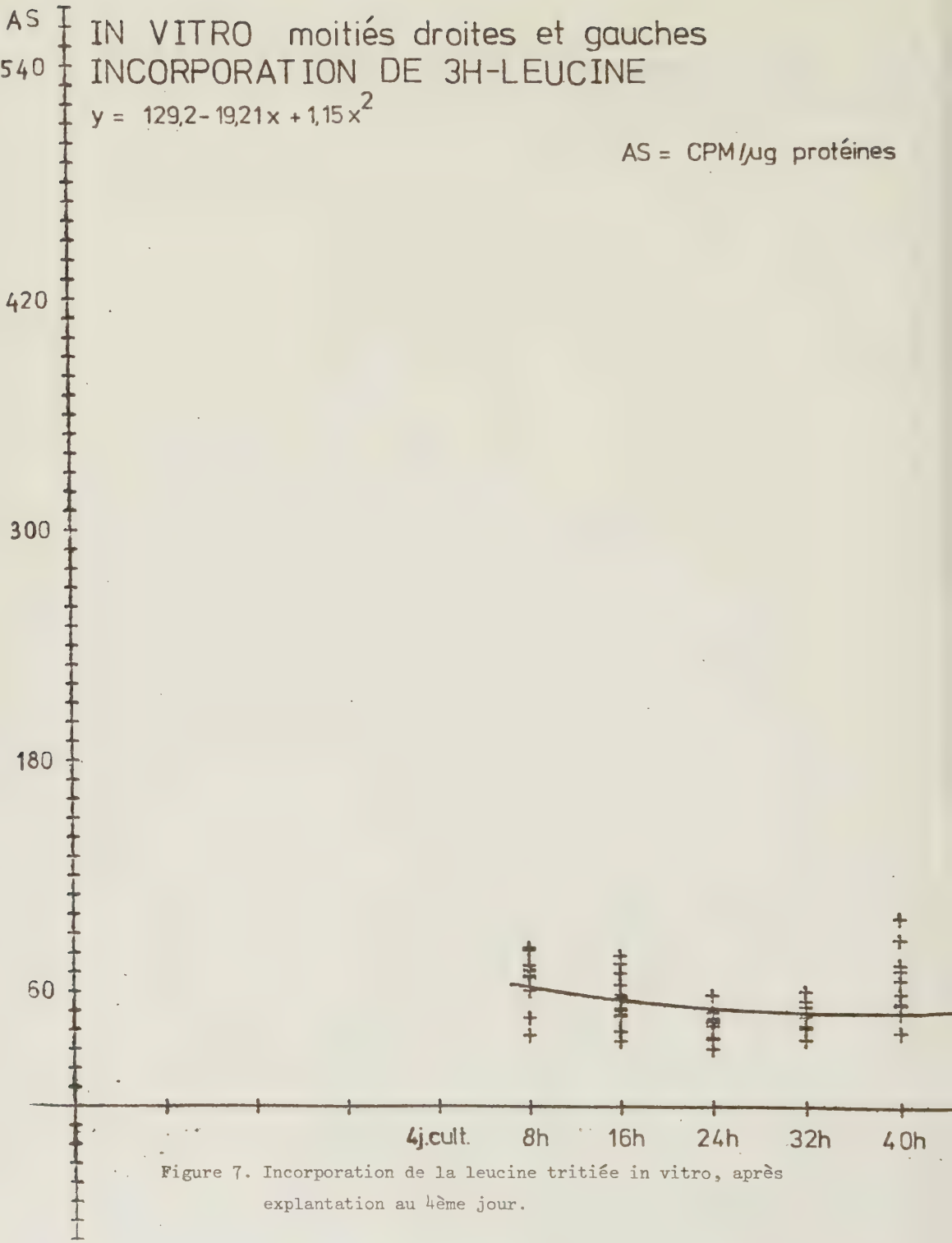

Figure 7. Incorporation de la leucine tritiée in vitro, après explantation au 4ème jour.

In ovo	Moyenne	Ecart-type
3j8h	4,43	1,70
3j16h	2,71	0,80
4j	1,99	0,80
4j8h	2,33	1,19
4j16h	2,28	0,95
5j	2,91	2,13
5j8h	1,06	0,35
5j16h	0,99	0,48
6j	0,83	0,24

Tableau XI: incorporation de la thymidine tritiée in ovo (en CPM/µg protéines), moitiés droites et gauches.

AS thymidine		
3j8h	>	3j16h
3j16h	>	4j
4j	·	4j8h
4j8h	·	4j16h
4j16h	·	5j
5j	>	5j8h
5j8h	·	5j16h
5j16h	·	6j

Tableau XII: différences entre les stades consécutifs in ovo, incorporation de la thymidine tritiée.

· = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

$<$ = significativement plus petit que, ($p \leq 0,05$)

$>$ = significativement plus grand que, ($p \leq 0,05$)

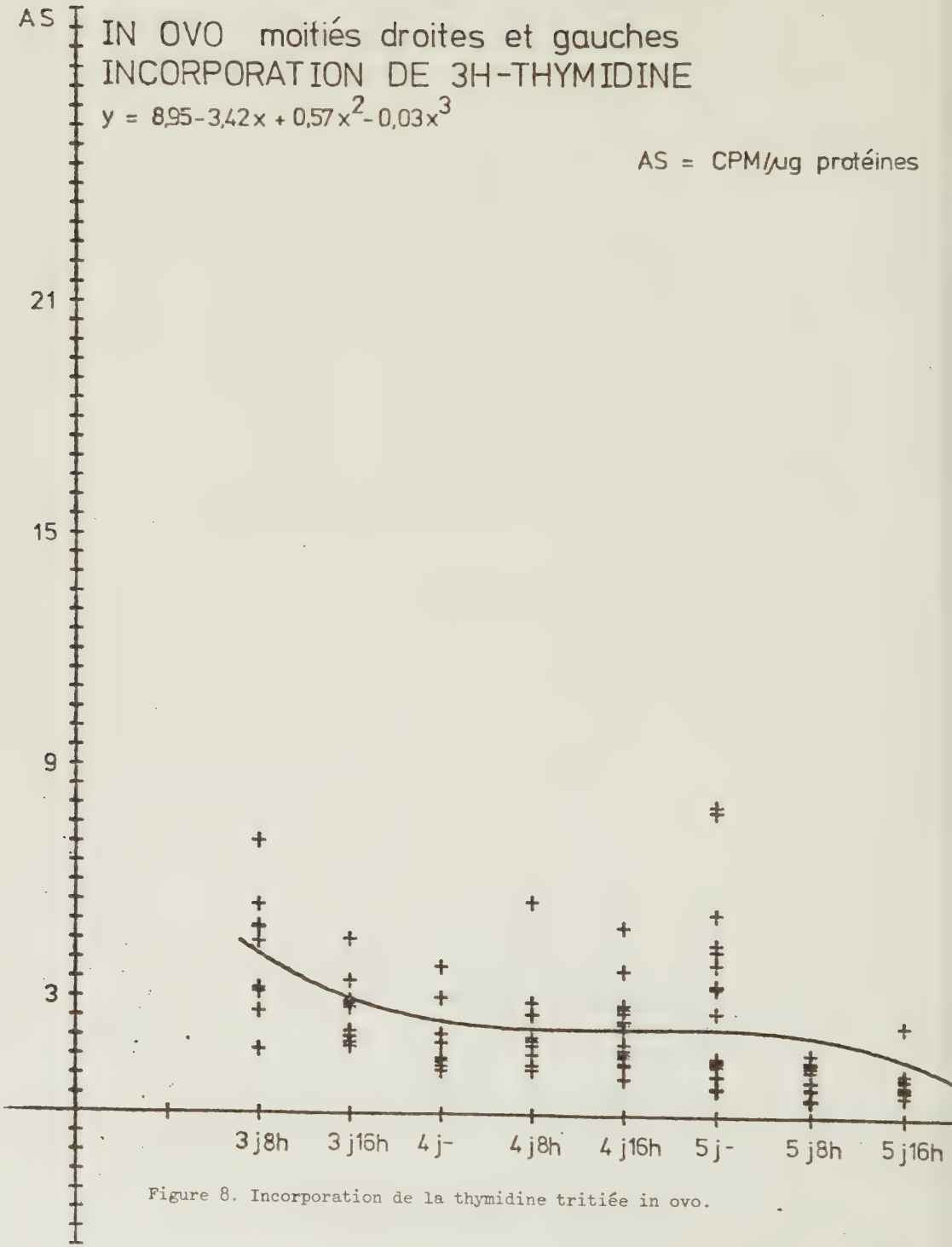

Figure 8. Incorporation de la thymidine tritiée in ovo.

In vitro	Moyenne	Ecart-type
3j cult.8h	2,18	1,47
3j cult.16h	12,46	4,87
3j cult.24h	4,92	2,85
3j cult.32h	7,29	3,68
3j cult.40h	4,49	3,25
4j cult.8h	2,11	1,05
4j cult.16h	1,99	1,62
4j cult.24h	1,78	1,27
4j cult.32h	3,56	1,67
4j cult.40h	2,03	0,75
4j cult.48h	3,80	1,86

Tableau XIII: incorporation de la thymidine tritiée in vitro (en CPM/µg protéines), moitiés droites et gauches.

AS thymidine
3j cult.8h $<$ 3j cult.16h
3j cult.16h $>$ 3j cult.24h
3j cult.24h $\cdot$ 3j cult.32h
3j cult.32h $>$ 3j cult.40h
4j cult.8h $\cdot$ 4j cult.16h
4j cult.16h $\cdot$ 4j cult.24h
4j cult.24h $<$ 4j cult.32h
4j cult.32h $>$ 4j cult.40h
4j cult.40h $<$ 4j cult.48h

Tableau XIV: différences entre les stades consécutifs in vitro, incorporation de la thymidine tritiée.

$\cdot$ = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

$<$ = significativement plus petit que, ($p \leq 0,05$)

$>$ = significativement plus grand que, ($p \leq 0,05$)

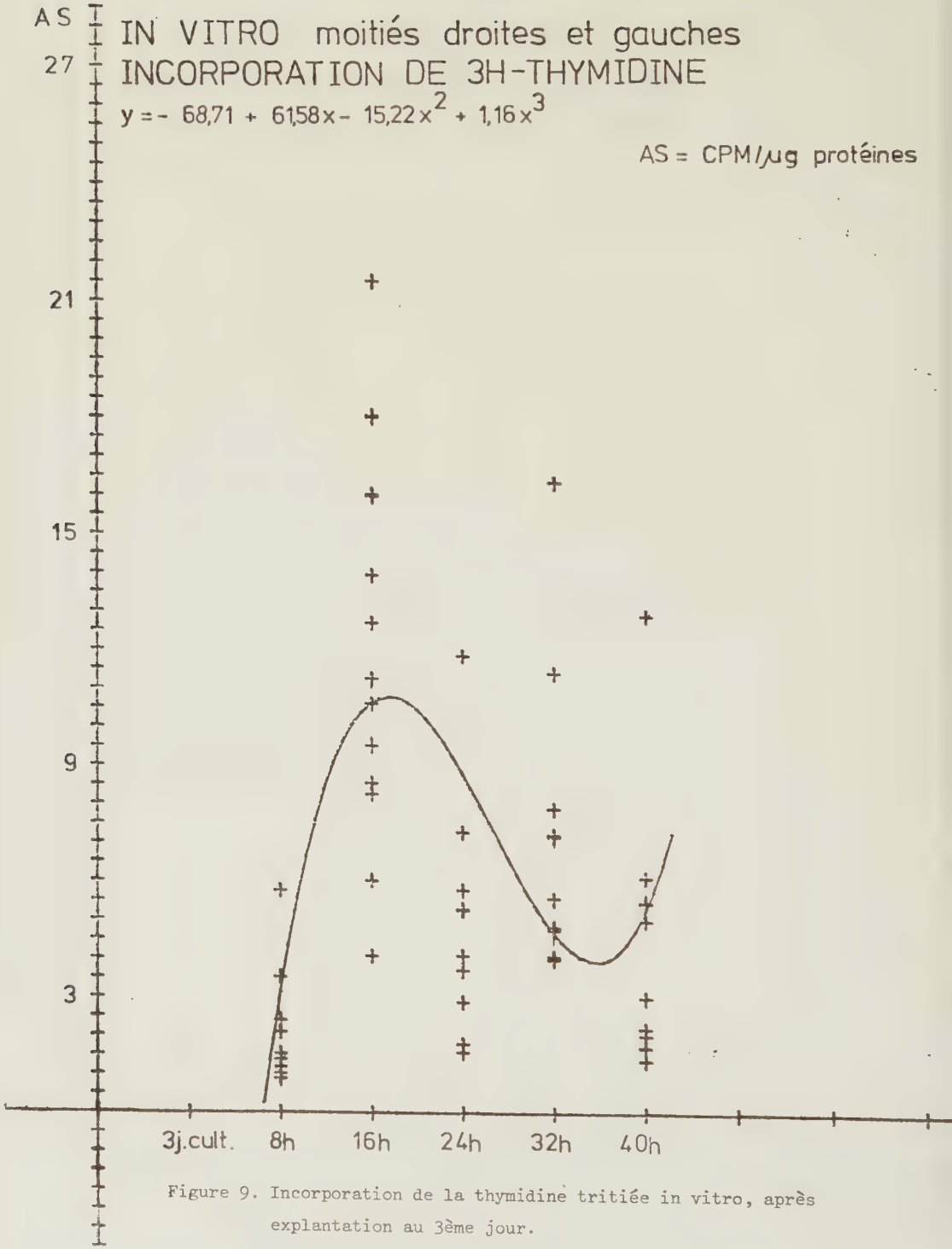

Figure 9. Incorporation de la thymidine tritiée in vitro, après explantation au 3ème jour.

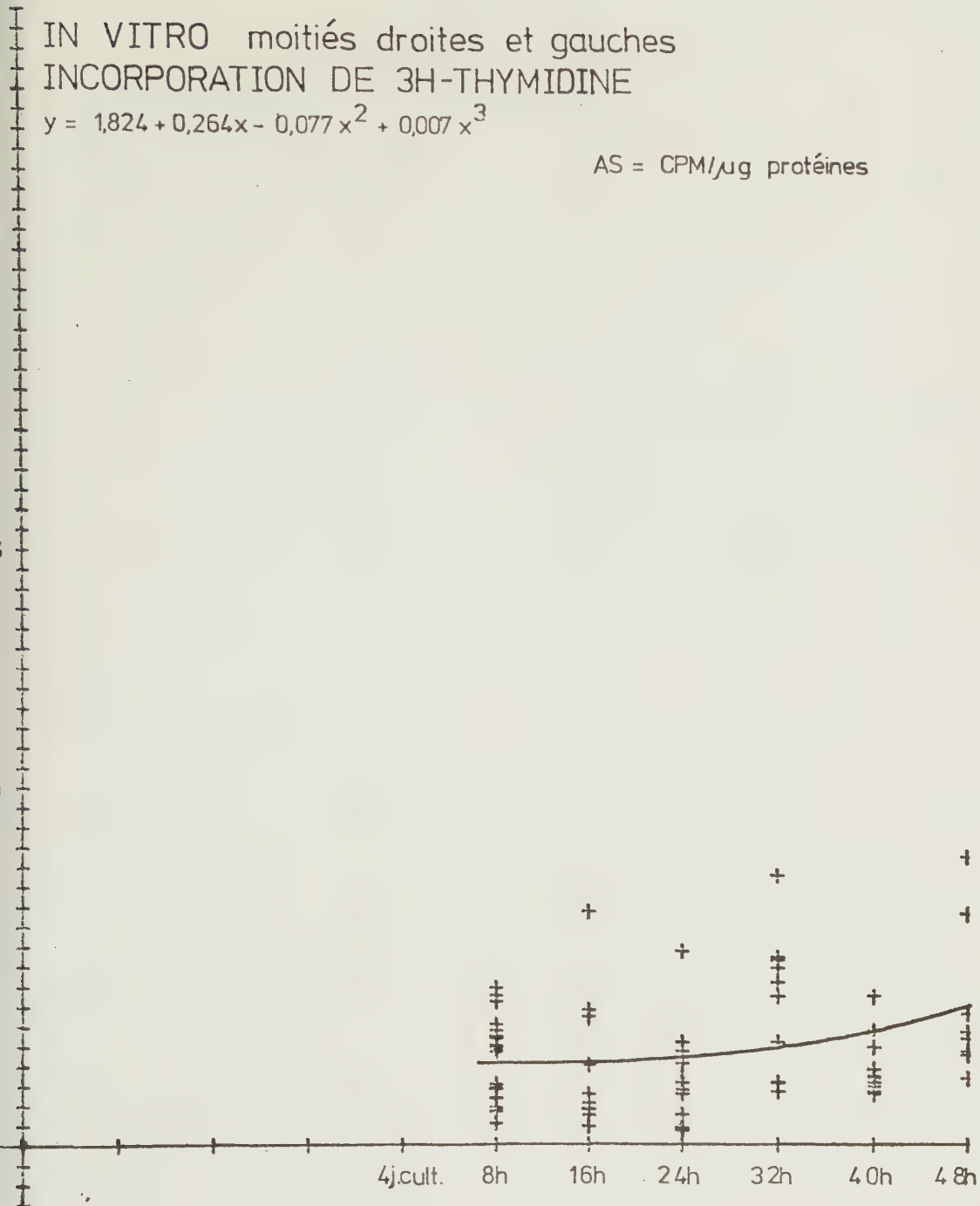

Figure 10. Incorporation de la thymidine tritiée in vitro, après explantation au 4ème jour.

Expérience 1

Protéines moitiés droites		
3j8h	•	3j cult.8h
3j16h	>	3j cult.16h
4j	>	3j cult.24h
4j8h	>	3j cult.32h
4j16h	>	3j cult.40h
4j8h	>	4j cult.8h
4j16h	>	4j cult.16h
5j	•	4j cult.24h
5j8h	>	4j cult.32h
5j16h	>	4j cult.40h
6j	>	4j cult.48h

a

Protéines moitiés gauches		
3j8h	>	3j cult.8h
3j16h	•	3j cult.16h
4j	>	3j cult.24h
4j8h	>	3j cult.32h
4j16h	>	3j cult.40h
4j8h	>	4j cult.8h
4j16h	>	4j cult.16h
5j	>	4j cult.24h
5j8h	>	4j cult.32h
5j16h	>	4j cult.40h
6j	>	4j cult.48h

b

Expérience 2

Protéines moitiés droites		
3j8h	•	3j cult.8h
3j16h	>	3j cult.16h
4j	>	3j cult.24h
4j8h	>	3j cult.32h
4j16h	>	3j cult.40h
4j8h	>	4j cult.8h
4j16h	>	4j cult.16h
5j	>	4j cult.24h
5j8h	>	4j cult.32h
5j16h	>	4j cult.40h
6j	>	4j cult.48h

c

Protéines moitiés gauches		
3j8h	•	3j cult.8h
3j16h	>	3j cult.16h
4j	>	3j cult.24h
4j8h	>	3j cult.32h
4j16h	>	3j cult.40h
4j8h	>	4j cult.8h
4j16h	>	4j cult.16h
5j	>	4j cult.24h
5j8h	>	4j cult.32h
5j16h	>	4j cult.40h
6j	>	4j cult.48h

d

Tableau XV: différences entre les stades comparables in ovo et in vitro, teneur en protéines.

•, <, > : cf. p. 39

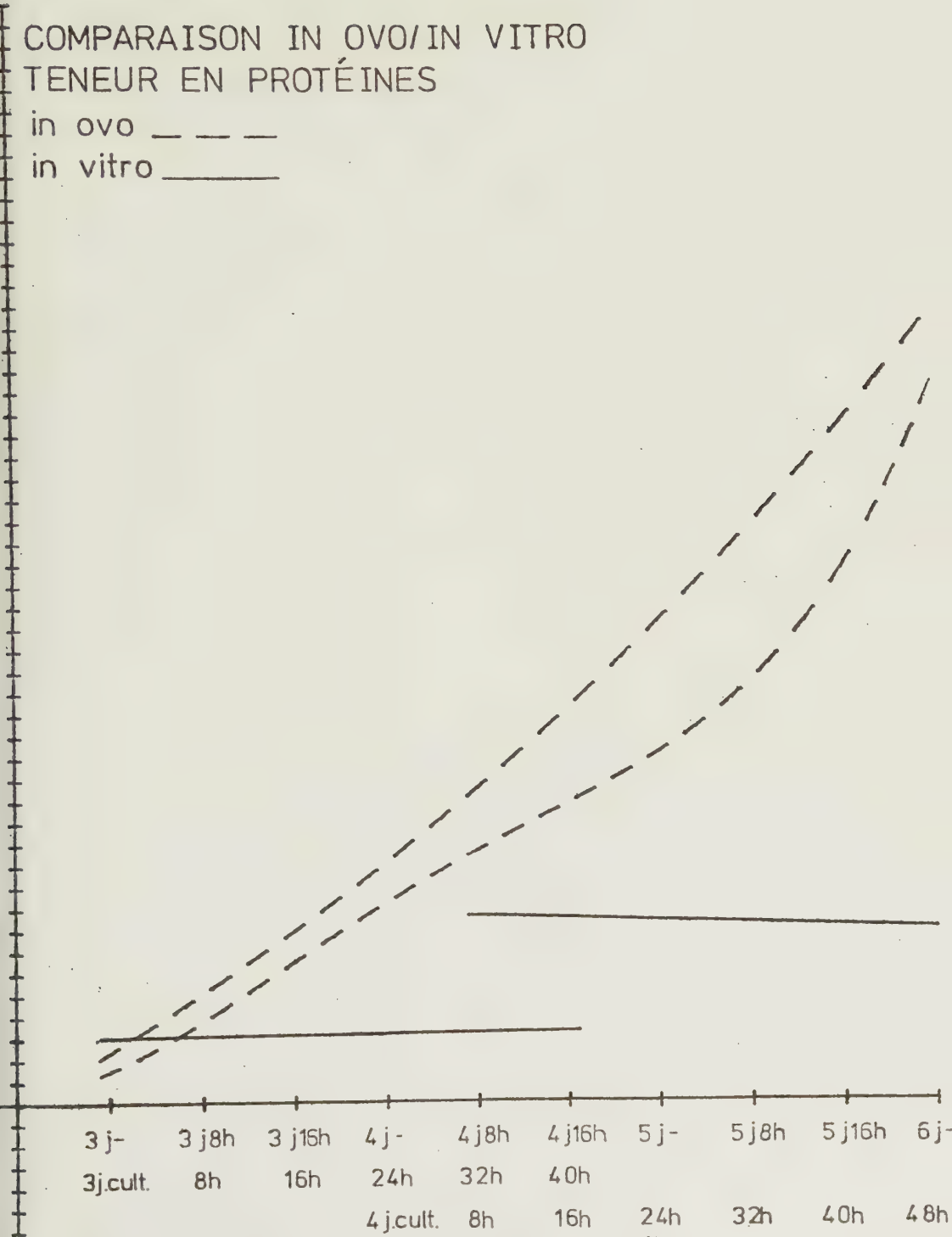

Figure 11. Comparaison in ovo/in vitro, teneur en protéines.

AS leucine		
3j8h	>	3j cult.8h
3j16h	·	3j cult.16h
4j	>	3j cult.24h
4j8h	·	3j cult.32h
4j16h	>	3j cult.40h
4j8h	>	4j cult.8h
4j16h	>	4j cult.16h
5j	>	4j cult.24h
5j8h	>	4j cult.32h
5j16h	>	4j cult.40h
6j	·	4j cult.48h

XVI

AS thymidine		
3j8h	>	3j cult.8h
3j16h	<	3j cult.16h
4j	<	3j cult.24h
4j8h	<	3j cult.32h
4j16h	<	3j cult.40h
4j8h	·	4j cult.8h
4j16h	·	4j cult.16h
5h	·	4j cult.24h
5j8h	<	4j cult.32h
5j16h	<	4j cult.40h
6j	<	4j cult.48h

XVII

Tableau XVI: différences entre les stades comparables in ovo et in vitro, incorporation de la leucine.

Tableau XVII: différences entre les stades comparables in ovo et in vitro, incorporation de la thymidine.

· = différence non significative, test de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

< = significativement plus petit que, ($p \leq 0,05$)

> = significativement plus grand que, ($p \leq 0,05$)

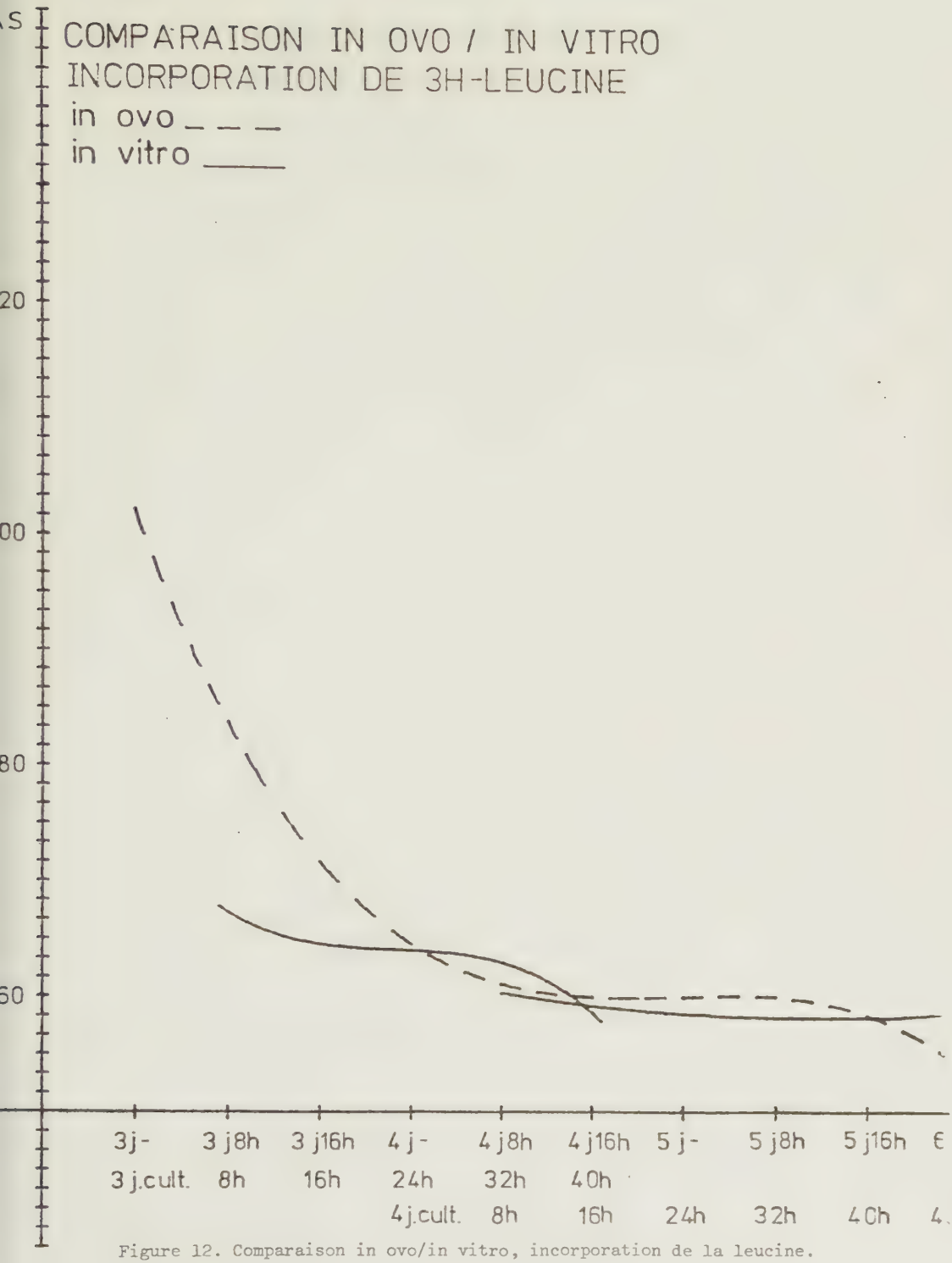

Figure 12. Comparaison in ovo/in vitro, incorporation de la leucine.

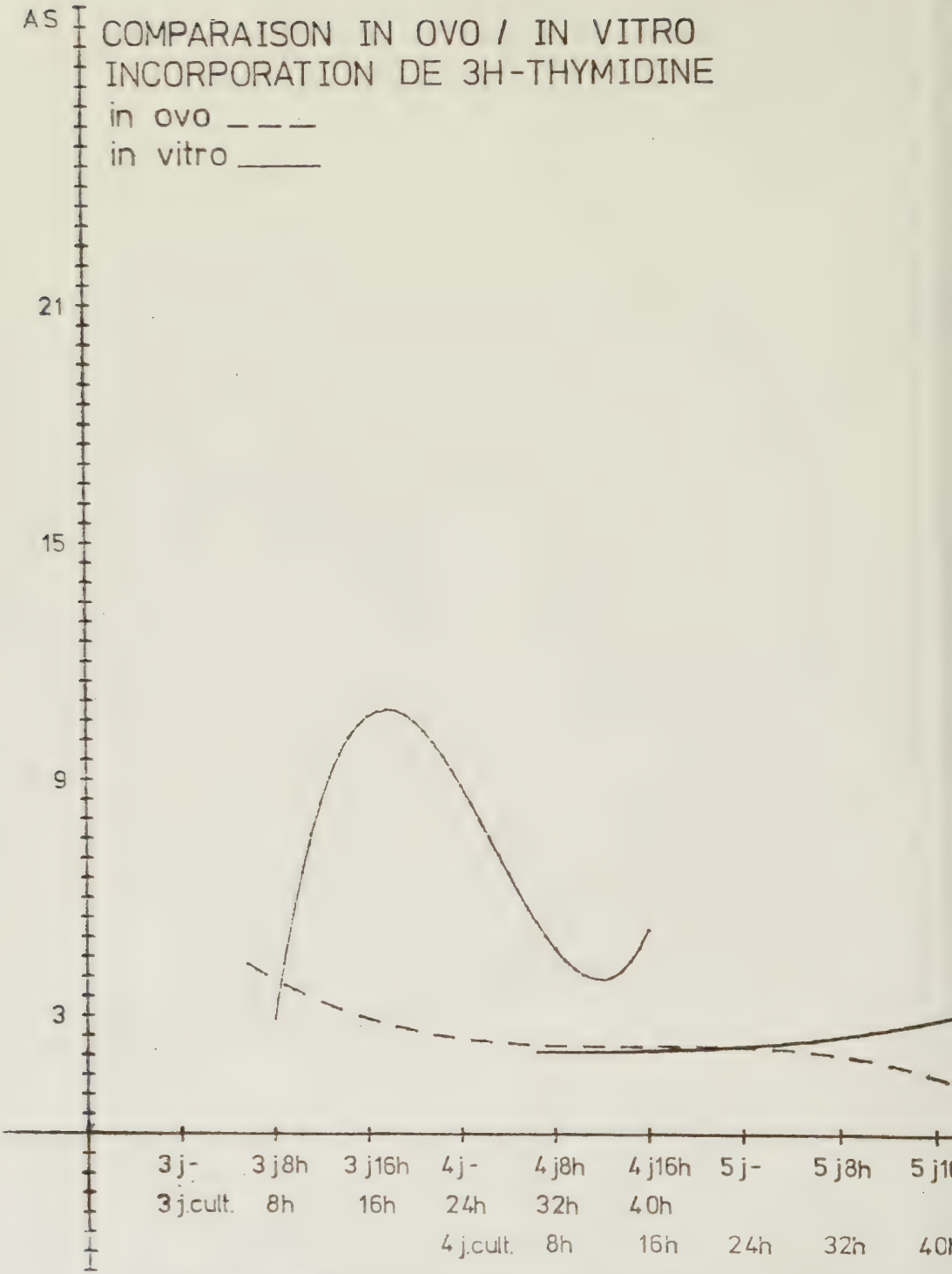

Figure 13. Comparaison in ovo/in vitro, incorporation de la thymidine.

En résumé la teneur en protéines du bulbe cardiaque embryonnaire du poulet entre 3 et 6 jours est significativement plus faible in vitro qu'in ovo, et ce dès 16 heures de culture, que ce soit après explantation au 3ème ou au 4ème jour. L'incorporation de la leucine in vitro y est d'une façon générale aussi plus faible qu'in ovo. L'incorporation de la thymidine par contre est fortement stimulée et plus élevée après explantation au 3ème jour qu'in vivo et inférieure et faiblement stimulée à la fin de la période de culture après explantation au 4ème jour.

IV. DISCUSSION

1. Méthodes

Lors des essais préliminaires, la méthode de marquage par immersion du bulbe excisé a été choisie parce qu'elle assure un taux constant de produit radioactif pendant les 2 heures d'incubation, alors que la méthode par injection de l'isotope dans la circulation embryonnaire dans l'oeuf a l'inconvénient de montrer une importante chute du taux plasmatique de la substance radioactive après environ 30 minutes de marquage déjà. Pour pouvoir comparer de manière sûre l'expérience in ovo et in vitro il fallait choisir une technique identique, ou qui assure des conditions de marquage identiques in ovo et in vitro, ce que réalise l'immersion dans la substance marquée diluée dans du liquide de Ringer.

Le dosage des protéines par le réactif de Folin a été choisi parce que nos besoins dans ce domaine rentraient dans les "applications raisonnables" de cette méthode préconisée par Lowry et coll. en 1951: "... mesures de protéines tissulaires mélangées, particulièrement lorsque la valeur absolue n'est pas nécessaire, quantités absolues faibles et analyses d'un grand nombre d'échantillons similaires...". Les limitations de la méthode sont celles décrites par Lowry et coll. (1951) et il est hors de propos d'y revenir ici. Il faut cependant ajouter que les standards (solutions connues d'albumine bovine) ont montré un maximum d'absorption de la lumière à 750 nm comme le décrivent Lowry et coll. (1951) alors que nos solutions de protéines de coeur embryonnaire de poulet ont montré, aux deux stades médians testés lors des essais préliminaires, un maximum d'absorption à 650 nm, raison pour laquelle nous avons choisi cette longueur d'onde pour la mesure de tous les échantillons et des standards. A 650 nm les solutions d'albumine bovine sont caractérisées par une absorption maximum de la lumière pour une concentration supérieure à

22,5 µg/ 100 µl et inférieure au maximum pour une concentration moindre. Ce phénomène a pu diminuer d'autant les quantités de protéines de nos échantillons les plus bas, mais cela n'influence pas la comparaison in ovo-in vitro puisque l'erreur expérimentale se produit dans les deux situations; de plus les valeurs absolues nous intéressaient moins.

La mesure de la radioactivité incorporée dans les protéines et l'ADN par la technique de la scintillation en phase liquide est une méthode couramment employée, nous n'y reviendrons donc pas (cf. Birks 1964). Il faut toutefois noter que les valeurs mesurées sur les aliquots de 50 µl des échantillons les plus faiblement radioactifs se rapprochaient de celle du bruit de fond et donc que le dosage perdait là de sa précision. Pour pallier cet inconvénient nous avons tenu compte, pour tous les échantillons, de la valeur de l'activité spécifique mesurée sur les échantillons de 50 et 100 µl selon la formule :

$$AS_x = \frac{AS_{x(50\ \mu l)} + AS_{x(100\ \mu l)}}{2}$$

Lors de la réalisation des mesures nous avons procédé à une première évaluation approximative des résultats obtenus en reportant sur papier millimétré les valeurs des protéines ou de la radioactivité de chaque stade en fonction du temps, ceci afin d'avoir une idée des rapports des divers stades entre eux. Si l'un des stades examinés, soit pour les protéines, soit pour l'activité spécifique, semblait complètement en dehors de la ligne générale qui se dessinait en fonction du temps pour l'ensemble des stades, nous avons procédé à un deuxième dosage en reprenant de nouveaux échantillons. Nous avons tenu compte de tous les dosages successifs de chaque stade pour l'élaboration statistique et les comparaisons.

2. Métabolisme des protéines

Le fait que la teneur en protéines in ovo augmente régulièrement en fonction du temps n'est pas surprenant. On peut en effet considérer que la mesure de la teneur en protéines remplace la mesure du poids sec, car les protéines représentent un peu plus de 68% du poids sec du coeur embryonnaire de poulet (Romanoff 1967). Nos analyses ont montré qu'en même temps que cette accumulation de protéines a lieu, l'incorporation de la leucine tritiée diminue tout d'abord puis se stabilise. Notons tout de suite que nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'expérience montrant l'incorporation de la leucine tritiée, ou de tout autre acide aminé marqué, dans les bulbes cardiaques d'embryons de poulet. Chez l'embryon de rat en revanche, Overmann et Beaudouin (1971) ont établi que l'incorporation de la leucine tritiée dans le coeur diminue entre 13 et 18 jours de développement. Cette baisse se fait selon un tracé qui ressemble au nôtre (13 à 18 jours de développement chez le rat correspondent à peu près à 4 à 8 jours de développement pour l'embryon de poulet /Sissman 1970/, on peut donc dire qu'il s'agit d'une période correspondante à celle que nous avons étudiée). Une autre observation intéressante a été rapportée par Gessner et Boström (1965): l'incorporation du sulfate radioactif dans le coeur embryonnaire de poulet diminue en fonction de l'âge de l'embryon entre les stades HH 14 et 24. Chez l'embryon de poulet entier explanté avec ses membranes extra-embryonnaires, Hayashi et Herrmann (1959) ont décrit un phénomène comparable: si l'on cultive ces embryons sur différents milieux pendant 8 à 24 heures, quand la croissance est bonne (croissance mesurée par l'augmentation de la teneur en protéines) l'incorporation de la glycine marquée, elle, n'augmente pas. Ces auteurs ont expliqué ce fait en postulant l'existence d'une source de glycine non marquée (pool intracellulaire) à laquelle la glycine marquée exogène ne se mélangerait pas. Transposée à notre cas cette explication pourrait

s'appliquer: on aurait l'augmentation d'un pool de précurseurs intra-cellulaires non marqué entre 3j et 4j8h de développement, puis une stabilisation de ce pool entre 4j8h et 5j8h, puis une nouvelle augmentation du pool entre 5j8h et 6j. Le fait que la leucine marquée ne se mélange pas au pool, donc que les précurseurs non radioactifs soient plus directement utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines, pourrait s'expliquer par une nature différente des deux sources de précurseurs: le pool non marqué pourrait être constitué de protéines ou de peptides provenant soit du jaune de l'oeuf soit de la dégradation de protéines intra-cellulaires (Bellairs 1971). Une certaine confirmation de cette explication peut être avancée par le travail de Klein (1968) qui montre que, pour se développer normalement, l'embryon de poulet entier explanté doit avoir dans son milieu nutritif soit du jaune d'oeuf soit de l'ovalbumine et du sérum; cela certifierait donc que l'embryon a besoin de protéines complètes pour sa croissance. Ces phénomènes demandent vérification par de nouvelles expériences qui dépassent le cadre de notre travail.

Nous n'avons pas rencontré dans la littérature de données sur la teneur en protéines du bulbe cardiaque in vitro. Plusieurs auteurs ont publié des chiffres concernant le coeur entier en culture organotypique: Kirmann et LeDouarin (1965) ont constaté que les coeurs d'embryons de poulet explantés sur milieu semi-solide type Wolff et Haffen et maintenus en culture pendant 6 jours ont une teneur en protéines (mesurée dans ce cas par la teneur en azote) qui diminue linéairement avec le temps et que ce phénomène n'est pas dû à une nécrose qui pourrait expliquer cette diminution par perte dans le milieu soit de protéines entières soit de produits de dégradation; Wildenthal (1972) a observé dans les coeurs foetaux de souris explantés au 19ème ou au 20ème jour et cultivés pendant 8 jours sur milieu liquide une diminution de la teneur en protéines allant jusqu'à 50% de la valeur initiale après 8 jours de

culture. Il a signalé de plus que l'adjonction d'insuline au milieu de culture réduit la perte de protéines des explants de près de 50%; ce qui devrait vraisemblablement être aussi le cas pour l'embryon de poulet puisque Green et Benzo (1973) ont détecté de l'insuline immunoréactive dès le 5ème jour du développement normal du poulet, dans le pancréas et dans le sérum; on peut donc supposer que l'insuline joue un rôle métabolique très tôt dans le développement de l'embryon de poulet. D'autres auteurs ont publié des données pour d'autres organes embryonnaires en culture organotypique. Yalovsky et coll. (1973) ont ainsi rapporté que le pancréas embryonnaire de poulet cultivé soit sur milieu semi-solide soit sur milieu liquide ne change pas de teneur en protéines pendant 5 jours de culture, alors que pendant la période correspondante in ovo les protéines s'accroissent de plusieurs fois leur valeur initiale.

Corradino (1973) a mis en évidence, dans l'intestin grêle d'embryons de poulet en culture organotypique sur milieu liquide, une fluctuation de la concentration en protéines: elle s'abaisse pendant les 12 premières heures de culture puis fluctue un peu jusqu'à 36 heures et remonte légèrement pendant les 12 dernières heures. Cintron (1972) lui, a dosé les protéines de la cornée embryonnaire de poulet en culture organotypique pendant 96 heures et il a trouvé d'abord une augmentation régulière pendant 48 heures, augmentation parallèle à celle qui se produit in ovo, puis une stabilisation. Kiény (1958) a décrit une croissance linéaire, pondérale et de la teneur en azote, des tibias embryonnaires de poulet cultivés in vitro sur un milieu type Wolff et Haffen (l'azote total augmente de 55 à 91% de sa valeur initiale en 7 jours de culture, la croissance est plus rapide pendant les deux premiers jours puis elle se ralentit). Si l'on considère maintenant les embryons de poulet entiers cultivés sur différents milieux, on s'aperçoit que la différenciation y est toujours bonne, voire comparable à celle

qui se produit in ovo, mais que la croissance pondérale, ou de la teneur en protéines, varie beaucoup selon les milieux employés et la quantité de membranes extra-embryonnaires explantées avec l'embryon (Britt et Herrmann 1959, Gluck et Kulovich 1964, Herrmann et Marchok 1962, Herrmann et Schultz 1958, Klein 1965, Hayashi et Herrmann 1959). Cela va de la croissance presque normale à la stabilité, en passant par tous les intermédiaires. Cette revue de la littérature confirme que nos résultats, compte tenu des limitations méthodologiques mentionnées plus haut, sont plausibles et non exceptionnels pour une culture d'organes sur milieu liquide sans insuline.

Il y a, à notre avis, deux façons d'expliquer cette absence de croissance de la teneur en protéines de nos explants. La première consiste à postuler une synthèse intacte et une dégradation accélérée des protéines dans nos conditions de culture. Notons que Wildenthal (1972) a prouvé une dégradation des protéines pour les coeurs foetaux de souris explantés en mesurant la perte d'acides aminés dans le milieu de culture et que Herrmann et Marchok (1962) l'ont démontrée pour l'embryon de poulet explanté en entier et cultivé dans des conditions de croissance sub-optimales. Nos expériences ne nous permettent pas d'évaluer une éventuelle dégradation des protéines dans nos explants. La deuxième explication consiste à postuler cette fois une synthèse diminuée et une dégradation normale. Cette baisse éventuelle de la synthèse devrait se marquer sur la courbe d'incorporation de la leucine tritiée in vitro. Cela semble bien être le cas après explantation au 3ème jour, où, en effet, la courbe débute à un niveau significativement plus bas qu'in ovo. Mais ensuite l'incorporation diminue moins rapidement in vitro qu'in ovo et reste à un niveau relativement élevé, puisqu'à 32 heures de culture la différence n'est pas significative avec le stade correspondant in ovo (4j8h).

Après explantation au 4ème jour, l'incorporation de la leucine est significativement plus basse in vitro qu'in ovo mais elle tend à monter après 32 heures de culture et il n'y a plus de différence à 48 heures de culture. Il y a donc bien une baisse de l'incorporation de la leucine tritiée in vitro mais elle est relativement faible par rapport à la baisse de la teneur en protéines pendant la même période. Cette divergence relative peut s'expliquer soit par une dégradation accélérée des protéines préformées, soit par une incorporation proportionnellement plus élevée de précurseurs marqués pour la même quantité de protéines synthétisée in vitro qu'in ovo. Ce phénomène pourrait être dû à la disparition in vitro du pool de précurseurs non marqués postulé in ovo (cf. plus haut) et donc à l'augmentation consécutive de l'activité spécifique du pool à partir duquel se construisent les protéines in vitro. Nous avons vu d'autre part que la dégradation accélérée ne peut pas être exclue ni confirmée. L'explication définitive de ce phénomène rest à démontrer par d'autres expériences.

3. Métabolisme de l'ADN

Si l'on admet le rôle de précurseur de l'ADN démontré pour la thymidine exogène par Runner (1970) chez l'embryon de poulet, la lente décroissance de l'incorporation de la thymidine tritiée in ovo doit donc traduire une baisse de la synthèse de l'ADN au cours du développement normal du bulbe cardiaque. Cette baisse est suivie, à partir de 4j8h environ, par une stabilisation de la synthèse puis par une nouvelle diminution à partir de 5j - 5j8h. Les faits suivants confirment qu'il s'agit bien d'une baisse de la synthèse de l'ADN pendant le développement normal. La diminution de l'index mitotique dans le myocarde de l'embryon de poulet mesurée par Grohmann (1961), la décroissance de l'index radioactif après incorporation de thymidine tritiée, établie par Sissman (1966), dans la couche endocardique du bulbe cardiaque

pendant la même période que nous, la baisse de l'index mitotique du coeur embryonnaire total publiée par Romanoff d'après des travaux de Olivo (1931), la diminution de l'index de marquage par la thymidine tritiée du coeur de poulet entier entre le stade HH 20 et le stade 30 décrite par Jeter et Cameron (1971) ainsi que la baisse de l'activité de l'ADN-polymérase, de l'incorporation de la thymidine tritiée et du taux d'accumulation de l'ADN du coeur de poulet entre le 8ème et le 21ème jour de développement signalée par Doyle et coll. (1974). De plus, selon Desveaux-Chabrol (1970), dans un organe en croissance puis en régression, en l'occurence le mésonéphros de l'embryon de poulet entre 10 et 18 jours d'incubation, l'incorporation de la thymidine tritiée décroît pendant la croissance de cet organe et croît pendant sa régression, ainsi d'ailleurs que l'incorporation de la leucine et de l'uridine tritiées. Tous ces travaux ne donnent pas de mesures de 8h en 8h comme nous mais de 24h en 24h, ce qui peut expliquer, en partie, les différences constatées par exemple au niveau de la stabilisation qui n'apparaît pas dans les données des autres auteurs, alors qu'elle est nette dans nos résultats. Nous pouvons aussi retenir que Neubert et coll. (1970) ont constaté une diminution de l'activité spécifique de l'ADN-polymérase entre le 11ème et le 14ème jour de développement du foie de l'embryon de rat, ce qui semble indiquer que la baisse de l'intensité de la synthèse de l'ADN pendant le développement normal n'est pas limitée au coeur embryonnaire de poulet mais se retrouve dans d'autres organes et dans d'autres espèces. Il faut aussi souligner que Held et Saunders (1965) ont observé une diminution du marquage par la thymidine tritiée des cellules de la zone nécrotique postérieure quelques heures avant leur dégénérescence physiologique, ce qu'on peut interpréter soit comme une baisse de la synthèse de l'ADN, soit comme une modification du cycle cellulaire, manifestant l'arrivée à l'heure de la mort cellulai-

re du "programme" contenu dans le génome de ces cellules ("death clock", Saunders 1966). Nos expériences nous permettent de constater cette baisse de la synthèse de l'ADN mais pas de l'expliquer.

In vitro après explantation au 3ème jour, la brusque élévation de l'incorporation après 8 heures de culture contraste vigoureusement avec la lente descente observée in ovo. Alors qu'après explantation au 4ème jour, la très lente descente, suivie de la très discrète remontée après 32 heures de culture, est beaucoup plus proche de ce qui se passe in ovo pendant la période correspondante, bien que les différences entre les valeurs observées in ovo et in vitro soient significativement différentes d'après le test de Wilcoxon.

Il y a une stimulation de l'incorporation de la thymidine après explantation au 3ème jour, donc une augmentation de la synthèse de l'ADN, augmentation qui ne se produit pas après explantation au 4ème jour. Cette stimulation pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs: premièrement les plaies d'excision du bulbe et de sa séparation en deux moitiés peuvent stimuler la synthèse de l'ADN car elles peuvent laisser migrer des cellules qui se comporteraient comme une culture de cellules se multipliant rapidement, donc synthétisant de l'ADN. Remarquons cependant que la composition du milieu de culture de nos explants avait été choisie expérimentalement justement pour limiter au minimum cette migration cellulaire à partir des plaies d'excision (Pexieder communication personnelle). Deuxièmement, on connaît depuis longtemps le rôle stimulant du sérum sur la multiplication des cellules en culture et sur leur synthèse d'ADN (Rothblat et Cristofalo 1972) et récemment Hsueh et Stockdale (1974) ont montré que le sérum, ajouté au milieu, déclenche la synthèse de l'ADN par les glandes mammaires de souris adultes en culture organotypique, ainsi d'ailleurs que l'insuline mais semble-t-il, par un mécanisme différent puisque leurs effets sont additifs.

Pour expliquer la disparition de la stimulation de la synthèse de l'ADN après explantation au 4ème jour, il faut postuler un changement au niveau cellulaire puisque toutes les autres conditions sont semblables au 3ème et au 4ème jour. Nous pouvons donc admettre qu'entre le 3ème et le 4ème jour il s'est passé quelque chose dans les cellules du bulbe cardiaque, qui les rend insensibles à l'effet stimulant de la mise en culture constaté au 3ème jour. Nos expériences ne permettent pas de dire quelle est la nature de ce phénomène: soit "death clock" (Saunders 1966) arrivée à l'heure de la dégénérescence, soit effet délétère de l'hémodynmique sur les cellules des coussinets bulbaires, soit combinaison des deux facteurs.

Dans d'autres organes en culture d'autres auteurs ont trouvé soit une stabilité, soit une oscillation de la teneur en ADN. Par exemple Yalovsky et coll. (1973) ont signalé que l'ADN du pancréas embryonnaire de poulet en culture organotypique restait stable pendant 5 jours alors qu'au cours de la période correspondante in ovo il s'accroissait de plusieurs fois sa valeur initiale. Cintron (1972) a observé une décroissance de la teneur en ADN des cornées de poulet en culture pendant les 12 premières heures in vitro (ce qu'il interprète comme un dégât cellulaire dû à l'explantation) puis un niveau stable, à part une augmentation transitoire dans le stroma cornéen, augmentation qu'il n'a pas pu expliquer. Selon Corradino (1973), la concentration de l'ADN dans l'intestin grêle de poulet augmente dans les explants pendant les 6 premières heures puis redescend pendant les 6 suivantes et ensuite diminue lentement jusqu'à 36 heures de culture pour remonter pendant les 12 dernières heures. En culture d'organismes entiers, en l'occurence d'embryons de poulet entiers, Klein et coll. (1971) ont rapporté que le coeur accroît sa quantité d'ADN pendant 36 heures de culture. Klein (1968) pour l'embryon de poulet entier en culture a trouvé une élévation de la teneur en ADN. Gwatkin et Biggers (1963) ont établi que les

cartilages tibiotarsaux embryonnaires de poulet, cultivés sur milieu naturel, augmentent leur teneur en ADN pendant 8 jours de culture et sur milieu synthétique pendant 7 jours et ceci d'à peu près 2/3 de l'accroissement qui se produit in ovo.

4. Comparaisons in ovo / in vitro

La superposition des courbes de régression obtenues à partir des résultats in ovo et in vitro donne une idée du déroulement comparatif des processus étudiés au cours du temps, mais elle ne permet pas de dire à quel moment (ou à partir de quel instant précis) il y a différence significative ou convergence des deux tendances. Le test de Wilcoxon comparant les paires de résultats ponctuels in ovo/in vitro exprime les différences entre le métabolisme étudié in ovo et in vitro à un moment précis (toutes les 8 heures), mais ne précise pas non plus la différence ou la convergence des tendances.

En tenant compte des limitations exprimées ci-dessus, nous pouvons quand même constater que pour la teneur en protéines il y a une différence significative ($p \leq 0,05$) dès 16 heures de culture, différence en défaveur de la culture, que ce soit après explantation au 3ème ou au 4ème jour. Pour l'incorporation de la leucine tritiée la différence est significative dès le début ($p \leq 0,05$) et tout au long des deux périodes de culture sauf à 3j cult. 16h et 3j cult. 32h. La différence se fait aussi au détriment de la culture. L'incorporation de la thymidine tritiée se comporte d'une autre manière, on l'a vu plus haut, puisque après explantation au 3ème jour elle est rapidement et fortement stimulée et supérieure en culture, alors qu'après explantation au 4ème jour il lui faut 32 heures de culture pour dépasser le niveau atteint in ovo. Ces différences autorisent à penser qu'il y a, pour les protéines, un trouble quantitatif du métabolisme (en l'occurence une baisse) en culture, et un trouble précoce puisque l'incorporation de la leu-

cine a déjà significativement diminué après 8 heures de culture. Pour la différence de métabolisme de la thymidine on peut moins généraliser puisque s'il y a bien augmentation lors des deux périodes de culture, le moment où elle survient et son intensité sont tellement dissemblables que l'on peut penser que le métabolisme doit être différent après explantation au 3ème et au 4ème jour malgré l'emploi de conditions de culture décrites par Fallon et Saunders (1968) comme favorables à une croissance et à une différenciation normales.

Comme plusieurs auteurs, tels Weber (1964), Tata (1966), Lockshin et Beaulaton (1974), ont prouvé que la synthèse des protéines (en fait des enzymes lytiques) est indispensable au déroulement normal de dégénérescences physiologiques de diverses structures chez plusieurs espèces, le fait qu'il y ait ce trouble important de la synthèse des protéines dans nos conditions de culture ne nous permet pas d'expliquer uniquement le manque de dégénérescences après explantation au 3ème jour et leur présence après explantation au 4ème jour par l'intervention de l'hémodynamique. De plus, la différence de comportement de l'incorporation de la thymidine après explantation au 3ème jour et après explantation au 4ème jour, si elle confirme bien qu'il se passe quelque chose entre le 3ème et le 4ème jour in ovo, ne nous précise pas la nature de cet événement: "death clock" (Saunders 1966) arrivée à l'heure décisive, influence pure de l'hémodynamique ou combinaison des deux, c'est-à-dire action délétère du courant sanguin sur des cellules rendues sensibles à son action (fragilisées) par programmation génétique.

Le facteur temps ne paraît pas identique in ovo et in vitro, puisque la culture produit soit un ralentissement soit une accélération des processus métaboliques et que le déroulement de ces événements semble être différent. En effet les courbes d'incorporation ou de teneur in vitro ne sont pas des répliques décalées en plus ou en moins, ou encore dans le temps, mais elles ont une allure générale différente.

Toutes ces différences nous permettent de penser que les événements qui se produisent en culture ne sont pas simplement et directement transposables à la situation in vivo, ce qui rejoint la constatation de Lash (1974) à propos des interactions des tissus embryonnaires in vitro, à savoir que les expériences pratiquées en culture n'ont pas (ou peu) de rapport avec ce qui se passe dans l'embryon.

Il faut ajouter à cela que d'autres auteurs ont décrit, non plus comme nous des différences quantitatives entre le métabolisme d'organes explantés et celui in vivo, mais des différences qualitatives. Par exemple Manasek et coll. (1973) ont démontré que le coeur embryonnaire de poulet cultivé in vitro entre le 11ème et le 13ème jour ne synthétise pas de sulfate de chondroïtine alors qu'à la même période les coeurs intacts le font, Benzo et de la Haba (1972) ont mis en évidence que le foie embryonnaire de poulet âgé de 5 jours, cultivé sur du MEM Eagle, ne développe pas la glycogène-synthétase, ni la glycogène-phosphorylase qui apparaissent normalement à ce moment in vivo et que par conséquent les dépôts de glycogène, et le réticulum endoplasmique lisse associé, n'apparaissent pas. Ces deux exemples suggèrent un défaut de maturation en culture et donc nous ramènent au problème de la différence du temps passé en culture par rapport à celui qui s'écoule in vivo, problème que nous avons évoqué plus haut.

5. Conclusion

Notre travail nous a permis de mieux définir, du point de vue métabolique quantitatif, le bulbe cardiaque entre 4 et 6 jours d'incubation in ovo et en culture organotypique, ce qui a son importance puisqu'il est utilisé dans notre institut pour des expériences d'embryologie et de tératologie. Les résultats obtenus et les différences constatées entre le métabolisme in ovo et in vitro ne nous au-

torisent pas à trancher définitivement entre les deux hypothèses de Pexieder (1972) sur les causes de la mort cellulaire physiologique dans les coussinets bulbaires. Pour le faire il faudra soit améliorer nos conditions d'explantation en modifiant la composition du milieu de culture pour arriver à un métabolisme aussi proche que possible de celui qui existe in ovo, soit procéder à une culture in ovo sur la membrane chorio-allantoïdienne par exemple. Finalement, nos résultats mettent en garde contre la transposition automatique et l'interprétation sans restrictions des expériences réalisées en culture organotypique.

V. RESUME

Afin de déterminer si les modifications introduites par la culture organotypique à l'intensité de la mort cellulaire physiologique dans les coussinets bulbaires du coeur embryonnaire de poulet sont dues à l'absence de l'hémodynamique ou aux conditions de culture, nous avons dosé les protéines et suivi l'incorporation de leucine et de thymidine tritiées dans le bulbe cardiaque de poulet in ovo entre 3 et 6 jours d'incubation et en culture organotypique sur milieu liquide pendant 40 heures après explantation au 3ème jour et pendant 48 heures après explantation au 4ème jour.

In ovo la croissance continue de la teneur en protéines s'accompagne d'une diminution de l'activité spécifique de la leucine et de la thymidine tritiées. In vitro la teneur en protéines est significativement plus faible dès 16 heures de culture que ce soit après explantation au 3ème ou au 4ème jour; l'incorporation de la leucine est moins élevée in vitro qu'in ovo, alors que l'incorporation de la thymidine est fortement stimulée après explantation au 3ème jour et seulement faiblement après 32 heures de culture après explantation au 4ème jour.

Les perturbations importantes du métabolisme des explants nous empêchent donc de trancher définitivement entre les facteurs génétiques (mort cellulaire programmée) et épigénétiques (hémodynamique) dans la causalité de la mort cellulaire physiologique des coussinets bulbaires du coeur embryonnaire de poulet.

Ce travail nous a permis de mieux caractériser du point de vue métabolique un modèle expérimental (le bulbe cardiaque de poulet) utilisé en embryologie et en tératologie et d'autre part de discuter d'une façon générale de la valeur de résultats obtenus en culture organotypique et de leur comparabilité avec les phénomènes observés in vivo, particulièrement en embryologie expérimentale.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Bellairs, R.: Developmental processes in higher vertebrates. Logos Press 1971

Benzo, C.A., de la Haba, G.: Development of chick embryo liver during organ culture: requirement for zinc-insulin. J. Cell. Physiol. 79, 53-64 (1972)

Biggers, J.D.: The growth in dry weight of embryonic chick tibiotarsi grown in vivo and in vitro. J. exp. Zool. 45, 227-242 (1960)

Birks, J.B.: The theory and practice of scintillation counting. Pergamon Press, Oxford 1964

Britt, L.G., Herrmann, H.: Protein accumulation in early chick embryos under different conditions of explantation. J. Embryol. exp. Morph. 7, 66-72 (1959)

Chen, J.M.: The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of foetal rats. Exp. Cell. Res. 7, 518-529 (1954)

Cintron, C.: Organ culture of chick embryonic cornea. Develop. Biol. 27, 100-115 (1972)

Corradino, R.A.: Embryonic chick intestine in organ culture. J. Cell Biol. 58, 64 - 78 (1973)

Desveaux-Chabrol, J.: Etude préliminaire du métabolisme des acides nucléiques et des protéines d'un organe embryonnaire en croissance puis en régression. C.R. Acad. Sc. Paris 271, 126-129 (1970)

Doyle, C.M., Zak, R., Fischman, D.A.: The correlation of DNA synthesis and DNA polymerase activity in the developing chick heart. Develop. Biol. 37, 133-145 (1974)

Fainstat, Th.: Submerged organ culture: an improved method. In Vitro 7, 300-303 (1972)

Fallon, J.F., Saunders, J.W. (jr): In vitro analysis of the control of cell death in a zone of prospective necrosis from the chick wing bud. Develop. Biol. 18, 553-570 (1968)

Gessner, I.H., Boström, H.: In vitro studies on ^{35}S-sulfate incorporation into acid mucopolysaccharides of chick embryo cardiac jelly. J. Exp. Zool. 160, 283-290 (1965)

Gluck, L., Kulovich, M.V.: Nucleic acid and protein changes during embryonic organ development in the chick. Yale J. Biol. Med. 36, 361-378 (1964)

Glücksmann, A.: Cell death in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. 25, 59-86 (1951)

Green, T.D., Benzo, C.A.: Radioimmunological evidence for early functionnal activity in chick embryonic beta cells. Am. J. Anat. 138, 401-405 (1973)

Grohmann, D.: Mitotische Wachstumintensität des embryonalen und fetalen Hühnchenherzens und ihre Bedeutung für die Entstehung von Herzmissbildungen. Zeit. Zellforsch. 55, 104-122 (1961)

Hamburger, V., Hamilton, H.L.: A series of normal stages in development of the chick embryo. J. Morphol. 88, 49-92 (1951)

Hayashi, Y., Herrmann, H.: Growth and glycine incorporation in chick embryo explants. Develop. Biol. 1, 437-458 (1959)

Herrmann, H., Marchok, A.: Gain and loss of protein in explanted chick embryos. Develop. Biol. 7, 207 (1962)

Herrmann, H., Schultz, P.W.: Incorporation of glycine into the proteins of explanted chick embryos. Arch. Biochem. Biophys. 73, 296-305 (1958)

Hewlett Packard: Calculator 9810A Quality assurance Pac Vol. 1 p. 19

Held, W.A., Saunders, J.W.: Incorporation of tritiated thymidine by nuclei in a zone of prospectively necrotic cells in the wing bud of the normal chick embryo. Am. Zoologist 5, 214 (1965)

Hsueh, H.W., Stockdale, F.E.: Serum and insulin initiation of DNA synthesis in mammary gland epithelium in vitro. J. Cell. Physiol. 83, 297-308 (1974)

Idoyaga-Vargas, V., Nasjleti, C.E., Azcurra, J.M.: Cytodifferentiation of the mouse secondary palate in vitro: morphological, biochemical and histochemical aspects. J. Embryol. exp. Morph. 27, 413-430 (1972)

Jeter, J.R., Cameron, I.L.: Cell proliferation pattern during cytodifferentiation in embryonic chick tissues: liver, heart and erythrocytes. J. Embryol. Exp. Morph. 25, 405-422 (1971)

Kallius, E.: Der Zelluntergang als Mechanismus bei der Histio- und Morphogenese. Anat. Anz. 72, Erg. H., 10-22 (1931)

Kirrmann, J.M., LeDouarin, G.: Effets d'une irradiation aux rayons X sur la consommation d'oxygène et la glycolyse en aérobiose d'organes embryonnaires de poulet en culture organotypique. C.R. Acad. Sci 257, 3235 (1963)

Kirrmann, J.M., LeDouarin, G.: Le métabolisme respiratoire d'organes embryonnaires cultivés in vitro. C.R. Soc. Biol. 159, 114-117 (1965)

Kiény, M.: Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'oiseau cultivés en milieu naturel et synthétique. Arch. Anat. Micr. Morph. exp. 47, 85-169 (1958)

Klein, N.W.: Teratological studies with explanted chick embryos. In: Teratology, Principles and Techniques (eds J.G. Wilson, J. Warkany) p.131-141. Chicago: the University of Chicago Press 1965

Klein, N.W.: Growth and development of chick embryo explants on various protein substrates. J. Exp. Zool. 168, 239-256 (1968)

Klein, N.W., Yager, J.D. (jr), Hagedorn, K.: The direct effect of protein starvation on protein breakdown and synthesis in regions of the cultured early chick embryo. Develop. Biol. 24, 178-197 (1971)

Lambert, A.E., Orci, L., Kanazawa, Y., Jeanrenaud, B., Renold, A.E.: Biochemical and morphological events associated with the development of fetal rat pancreas in vivo and in vitro: effect of glucagon and other agents. Acta Isotop. 10, 191-204 (1970)

Lash, J.: Tissue interactions and related subjects. In: Concepts of development (eds J. Lash, J.R. Whittaker) p. 197-212. Stamford, Connecticut: Sinauer Associates 1974

LeDouarin, G.: Etude de l'action des rayons X sur la physiologie et l'organogénèse du coeur embryonnaire de poulet. Bull. Biol. France, Belgique 97, 643-759 (1963)

LeDouarin, G., Kirrmann, J.M.: Action des rayons X sur la teneur en coenzyme I et sur l'activité de la coenzyme I glycolhydrolase chez le coeur embryonnaire de poulet en culture organotypique. C.R. Acad. Sci 259, 2153 (1964)

LeDouarin, G., Obrecht, G., Coraboeuf, E.: Activité électrique transmembranaire du coeur embryonnaire de poulet explanté en culture organotypique. C.R. Acad. Sci 258, 3911 (1964)

LeDouarin, G., Obrecht, G., Coraboeuf, E.: Activité électrique transmembranaire de vésicules pulsatiles différenciées en culture organotypique par des fragments de l'aire précardiaque de l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sci 260, 287-290 (1965)

LeDouarin, G., Obrecht, G., Coraboeuf, E.: Déterminations régionales dans l'aire cardiaque présomptive mises en évidence chez l'embryon de poulet par la méthode microélectrophysiologique. J. Embryol. exp. Morph. 15, 153-167 (1966)

LeDouarin, G., Renaud, D.: Différenciation en milieu liquide et culture de longue durée du tissu myocardique embryonnaire. C.R. Soc. Biol. 161, 436-440 (1967)

Lockshin, R.A., Beaulaton, J.: Programmed cell death. Cytochemical appearance of lysosomes when the death of the intersegmental muscles is prevented. J. Ultrastruct. Res. 46, 63-78 (1974)

Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Manasek, F.J., Reid, M., Vinson, W., Seyer, J., Johnson, R.: Glycosaminoglycan synthesis by the early embryonic chick heart. Develop. Biol. 35, 332-348 (1973)

Maximov, A.: Tissue cultures of young mammalian embryos. Contrib. Embryol. Carnegie Inst. Wash. 16, 49-113 (1925)

Monnickendam, M.A., Balls, M.: Amphibian organ culture. Experientia 29, 1-17 (1973)

Neubert, D., Koehler, E.: Comparative studies on nucleic acid metabolism during mammalian embryonic development and during proliferation of other tissues induced by hormones or drugs. In: Proc. IVth Intern. Congr. Pharmacol. vol. IV. Symposia (ed R. Eigenmann) p. 307-317. Basel: Schwabe & Co. 1970

Overmann, D.O., Beaudouin, A.R.: Early biochemical changes in the embryonic rat heart after teratogen treatment. Teratology, 4, 183-190 (1971)

Obrecht, G., LeDouarin, G., Coraboeuf, E.: Activité électrique transmembranaire de fragments de coeur embryonnaire de poulet en culture organotypique. J. Physiol. 56, 414 (1964)

Obrecht, G., LeDouarin, G., Coraboeuf, E.: Aspects électrophysiologiques de l'automatisme du myocarde ventriculaire chez l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sci 267, 765 (1968)

Parker, R.C.: J. Exptl. Med. 64, 121, 1936, cité par Chen, 1954

Paul, J.: Cell and tissue culture. 4th edition, Edinburgh & London: Livingstone 1970

Pexieder, T.: Die quantitative Karte des Zellunterganges in der Herzentwicklung der Hühnerembryonen zwischen dem 2. und 8. Tag der Inkubation. Anat. Anz. 128, Erg. H., 295-300 (1971)

Pexieder, T.: The tissue dynamics of heart morphogenesis. I. Cell death phenomena. A. Identification and morphology. Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 137, 270-284 (1972 a)

Pexieder, T.: The tissue dynamics of heart morphogenesis. I. Cell death phenomena. B. Topography. Z. Entwickl.-Gesch., 138, 241-253 (1972 b)

Pexieder, T.: Beobachtungen über den lokalen Zelltod während der Herzbulbusseptierung des Hühnerembryos. Anat. Anz. 130, Erg. H., 279-286 (1972 c)

Pexieder, T.: Über die Wirkung der Haemodynamik auf den Zelluntergang in der Herzbulbuswülsten des Hühnerembryos. Acta anat. (Basel) 82, 459-460 (1972 d)

Pexieder, T.: Über die primären Ursachen des Zelltodes in der Herzbulbuswülsten des Hühnerembryos. Anat. Anz. 134, Erg. H., 183-187 (1973)

Pexieder, T., Paschoud, N.: La stabilité phylogénétique des zones de mort cellulaire physiologique dans l'organogénèse du coeur. Acta anat. (Basel) 86, 321 (1973)

Renaud, D., LeDouarin, G.: Influence de l'environnement tissulaire et des conditions de culture sur l'évolution du mésoderme précardiaque de l'embryon de poulet. C.R. Acad. Sci 267, 431-434 (1968)

Renaud, D., LeDouarin, G.: Etudes électrophysiologiques de l'influence de l'histogénèse et de la morphogénèse sur la différenciation cellulaire du myocarde. C.R. Soc. Biol. 163, 959-963 (1969)

Romanoff, A.L.: The avian embryo. New York: Macmillan 1960

Romanoff, A.L.: Biochemistry of the avian embryo. New York: Interscience Publishers 1967

Rothblatt, G.H., Cristofalo, W.J. (eds): Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. London: Academic Press 1972

Runner, M.N.: Uridine and thymidine; precursors to DNA in the chick embryo? Anat. Rec. 166, 370 (1970)

Saunders, J.W. (jr): Cell death in embryonic systems. Science 154, 604-612 (1966)

Sissman, N.J.: Cell multiplication rates during development of the primitive cardiac tube in the chick embryo. Nature 210, 504-507 (1966)

Sperelakis, N., Forbes, M.S., Shigenobu, K., Coburn, S.: Organ-cultured chick embryonic hearts of various ages. I. Electrophysiology. II. Ultrastructure. J. Molec. Cell. Cardiol. 6, 449-471, 473-483 (1974)

Strangeways, T.S.P., Fell, H.B.: Experimental studies of the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. I. The development of the undifferentiated limb bud. Proc. Roy. Soc. B 99, 340-364 (1926)

Tata, J.R.: Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. Develop. Biol. 13, 77-94 (1966)

Thompson, D.: Controlled growth en masse (somatic growth) of embryonic chick tissue in vitro. 1914, cité par Strangeways et H.B. Fell (1926)

Trowell, O.A.: A modified technique for organ culture in vitro. Exp. Cell Res. 6, 246-248 (1954)

Weber, R.: Ultrastructural changes in regressing tails muscles of Xenopus larvae at metamorphosis. J. Cell Biol. 22, 481-487 (1964)

Wildenthal, K.: Long-term maintenance of spontaneously beating mouse hearts in organculture. J. Appl. Physiol. 30, 153-157 (1971)

Wildenthal, K.: Protein breakdown inhibited by insulin to improve heart culture. Nature 339, 101-102 (1972)

Wolff, E.: Les propriétés générales des organes embryonnaires en culture in vitro. Acta anat. 30, 952-969 (1957)

Wolff, E.: The general principles of organ culture in vitro. In: Organ Culture (J.A. Thomas ed.) London: Academic Press 1970

Wolff, E., Haffen, K.: Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Tex. Rep. Biol. Med. 10, 463-472 (1952)

Yalovsky, U., Heller, H., Kulka, R.G.: Accumulation of amylase by chick pancreas in organ culture. Exp. Cell Res. 80, 322-328 (1973)